

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

UNIDAD DE POST-GRADO

**Rol del óxido nítrico en modelos experimentales
propuestos para inducir inflamación gástrica e
intestinal en ratas**

TESIS

para optar al grado académico de Doctor en Farmacia y Bioquímica

AUTOR

Pedro Angulo Herrera

Lima-Perú

2009

“A Dios le debo la fe y a mi profesión las gracias”

A la memoria sagrada de mis padres.
Que sus almas descansen en paz,
sus ilusiones en mí se cumplen y
alcance la felicidad sobre el fundamento
de la amistad, la base del amor y
el reto: la vida

A mi asesor, **Dr Roger Ramos Aliaga**, por
su valiosa orientación y su consejo científico en la
realización del presente trabajo de investigación.

TESIS

Para optar el grado académico de Doctor en
Farmacia y Bioquímica

Presentado por

Mg. Pedro Angulo Herera

LIMA – PERÚ

2008

INDICE

RESUMEN

SUMARY

- I. INTRODUCCIÓN
- II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA
- III. PARTE EXPERIMENTAL
- IV. RESULTADOS
- V. DISCUSIÓN
- VI. CONCLUSIONES
- VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

RESUMEN

Actualmente se vienen usando varios modelos que utilizan al etanol (EtOH) y la indometacina (Indo) para inducir inflamación gástrica e intestinal en forma experimental. Con el objeto de determinar cuál es el rol del óxido nítrico (NO) en la inflamación gástrica e intestinal, hemos utilizado como donadores de NO al nitrito de sodio (NIT), nitroprusiato de sodio (NPS) y metronidazol (MET); y como inhibidor inespecífico de la sintasa del NO a la *N*^G-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME) y el azul de metileno (AM) como inhibidor del guanidin monofosfato cíclico (GMPc). Se utilizaron 620 ratas albinas macho (Holtzman) que fueron adaptadas a las condiciones del laboratorio de Farmacología, Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM y privadas de alimento pero no de agua por 24 horas antes de la inflamación gástrica aguda inducida por EtOH (Robert *et al.*, 1979), y con Indo (Davies y Jamali, 1997). La inflamación intestinal aguda (Ramos Anicama, 2003) y crónica (Yamada *et al.*, 1993) fue inducida con Indo. El daño macroscópico fue determinado en un microscopio calibrado en milímetros (mm), y también por planimetría computarizada que mide el porcentaje de la lesión. La determinación del NO fue indirecta cuantificando en el plasma su metabolito estable, el nitrito, mediante la reacción de Griess. Nuestros resultados demuestran que el NO participa como citoprotector en los modelos de inflamación aguda; y como proinflamatorio en el modelo de inflamación intestinal crónica. La determinación que el NO participa en el modelo de Yamada *et al.* nos ha permitido encontrar una nueva evidencia científica de la actividad antiinflamatoria de las hojas de *Uncaria tomentosa* Willd D.C. ("uña de gato").

SUMMARY

Nowadays it comes using several models who use ethanol (EtOH) and indomethacin (Indo) to induce the gastric and intestinal inflammation in experimental form. In order to determine which is the role of nitric oxide (NO) in the gastric and intestinal inflammation, we have used sodium nitrite (NIT), sodium nitroprusiate (NPS) and metronidazole (MET) as NO donors; *N*^G-nitro-L-arginine-methyl ester L-NAME) was used as unspecific NO syntasa inhibitor and methylene blue (AM) like guanidine cyclical monophosphate (GMPc) inhibitor. 620 albino male rats (Holtzman) were used who before were conditioned in the laboratory of Pharmacology, Toxicology of the UNMSM Faculty of Veterinary Medicine and private of food but not of water for 24 hours before the induction of the acute inflammation induced for EtOH (Robert *et al.*, 1979), and with Indo (Davies and Jamali, 1997). The intestinal acute inflammation (Ramos Anicama, 2003) and the intestinal chronic inflammation (Yamada *et al.*, 1993) was induced by Indo. The macroscopic damage was determined in a calibrated microscope and also by computerized planimetry. NO determination was quantifying indirectly in the plasma its stable metabolite: the nitrite, by means of Griess reaction. Our results demonstrate that NO take part as cytoprotector in the models of acute inflammation; and is proinflammatory in the intestinal chronic inflammation model. The discovery that NO take part in the model of Yamada *et al.* has allowed us to find a new scientific evidence of the inflammatory activity of the leaves of the *Uncaria tomentosa* Willd D.C. (cat's claw).

I INTRODUCCION

El óxido nítrico (NO) es un potente mensajero biológico en una variedad de tejidos. Participa en funciones fisiológicas, como: relajación del músculo liso (vasodilatación), inhibición de la agregación plaquetaria dentro de la microvasculatura, regulación de la neurotransmisión, en la defensa del sistema inmune natural y la erección peneana (1, 2). La producción de NO por las células, requiere la presencia de una o más de las tres isoformas reconocidas hasta ahora de la sintasa del NO (NOS) (3, 4). Dos de ellas (tipo endotelial eNOS y tipo neuronal nNOS) son expresadas constitutivamente y requieren la presencia de Ca^{++} intracelular y calmodulina; la otra isoforma (tipo inducible iNOS, descubierta inicialmente en los macrófagos) usualmente se induce en el organismo durante la inflamación por la presencia de ciertas citoquinas inflamatorias y/o productos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS). La iNOS pueden funcionar independientemente del Ca^{++} citosólico y la calmodulina (5).

La mucosa gastrointestinal está muy expuesta a altas concentraciones de xenobióticos y microorganismos que pueden ser causa de enfermedades entéricas en el hombre y los animales. Aunque la etiología de la inflamación gastrointestinal aún no está totalmente definida, actualmente muchas investigaciones evidencian que los radicales libres y los oxidantes tienen un rol importante en el daño a nivel celular y en consecuencia dan lugar a lesiones tisulares como las úlceras. Este proceso oxidativo puede agravarse, y de hecho así sucede, por la disminución de antioxidantes fisiológicos en el proceso inflamatorio (6). Los tratamientos actuales además de ser costosos, son poco satisfactorios; además, los medicamentos presentan reacciones colaterales que limitan su uso (7).

Actualmente, en los trabajos de investigación se vienen usando varias sustancias para inducir la inflamación gástrica e intestinal de manera experimental; las más comunes son el etanol y la indometacina.

Los estudios focalizados en la patogénesis del daño a la mucosa gástrica inducida por el EtOH sugieren que el evento inicial es la disrupción del endotelio vascular resultando en un aumento de la permeabilidad vascular, formación de edema, y desprendimiento epitelial (8, 9, 10). El compromiso del endotelio nos ha permitido pensar en la posibilidad de la participación del NO en esta patología.

En los últimos años, un gran número de estudios han destacado la importancia de las alteraciones en el flujo sanguíneo de la mucosa gástrica después de la administración de los antiinflamatorios no esteroides (AINES) en la patogénesis de la ulceración que se observa en varios modelos experimentales. Ashley *et al.* (11) y Gana *et al.* (12) demostraron que AINES causaron una reducción en el flujo sanguíneo a la mucosa gástrica. Kitahora y Guth (13) notaron, además, que la reducción del flujo sanguíneo inducido por la aplicación de aspirina en el estómago de la rata fue precedido por la adherencia de los leucocitos a las paredes de los vasos en la microcirculación de la mucosa y que las lesiones hemorrágicas se forman en las regiones de perfusión reducida. Esas observaciones han sugerido un rol de los leucocitos circulantes en la patogénesis de la ulceración inducida por AINES. Además, es bien conocido que la activación de los neutrófilos produce la liberación de especies reactivas del oxígeno (EROs) y que éstos juegan un rol en varios modelos de daño gastrointestinal; p.e. el daño por isquemia-reperfusión (I/R) al intestino y el estómago puede ser reducido por varios antioxidantes (14, 15). Sin embargo, en estos estudios no se menciona la participación del NO.

De acuerdo a los conocimientos actuales, el NO es un potente vasodilatador y puede inhibir la agregación plaquetaria (16). Cuando la indometacina produce daño a la mucosa gástrica ocurre la adherencia de los leucocitos al endotelio postcapilar resultando en parcial oclusión de los microvasos (hipoxia/isquemia) gástricos produciendo daño celular al endotelio y epitelio lo cual es mediado por radicales libres (17, 18). En 1999, Lefer demostró que el NO previene esos daños (19). McCafferty *et al.*, también han demostrado que cuando hay sobreproducción de NO en el intestino se transforma en un factor que media en la inflamación intestinal crónica (20).

En países en vía de desarrollo como el nuestro, se vienen usando remedios herbales en una amplia variedad de problemas de la salud, particularmente en males digestivos. Dentro de estos recursos vegetales terapéuticos utilizados, está la *Uncaria tomentosa* Will D.C. conocida como “uña de gato” (UG). Sandoval-Chacón *et al.* (21) han utilizado el modelo de inflamación intestinal crónica propuesta por Yamada *et al.* en 1993 (22) para evaluar *in vivo* la acción antiinflamatoria de la corteza de la UG. Nosotros (23) hemos extendido este trabajo a las hojas de la UG y recientemente Giraldo y Hernández (24) han evaluado la actividad antinitrosativa y antiinflamatoria de los flavonoides de las hojas de de la UG. En estos estudios no se ha considerado el rol del NO en el modelo de inflamación intestinal crónica propuesta por Yamada *et al.* (22).

Entonces, nos propusimos determinar el rol del NO en algunos modelos experimentales que utilizan al EtOH y la Indo para inducir la inflamación gástrica e intestinal en ratas; para lo cual, nos fijamos los siguientes objetivos:

1. Demostrar la participación del NO en la inflamación gástrica e intestinal aguda, inducidas experimentalmente en ratas
2. Evaluar el efecto protector de algunos donadores de NO en el modelo agudo de inflamación gástrica inducida por el EtOH y la Indo.
3. Demostrar la participación de los derivados del NO en la inflamación intestinal crónica experimental
4. Evaluar el efecto protector de las hojas de *Uncaria tomentosa* en el modelo de inflamación intestinal crónica propuesta por Yamada *et al.* (22).

II GENERALIDADES

II.1. INFLAMACION POR ETANOL

Robert (25) ha descrito un modelo para producir necrosis gástrica extensiva en ratas dentro de una hora. Consiste en la administración oral, después de 24 horas de ayuno, de 1 ml de EtOH absoluto.

Szabo *et al.* (8) han puesto en evidencia el componente hemorrágico de la lesión aguda a la mucosa gástrica inducida por el EtOH, estos autores han demostrado que el inicio del daño vascular en la mucosa del estómago glandular de la rata se produce dentro de 1 minuto después de la administración intragástrica de EtOH; y que el daño vascular se incrementa con la exposición de la mucosa gástrica a concentraciones incrementadas del EtOH. Estos resultados sugieren que el daño endotelial precede y puede ser responsable para el desarrollo de la hemorragia inducida por el EtOH en la rata (8). Además, otros factores han sido implicados: productos del metabolismo del ácido araquidónico, EROs y productos de los mastocitos (26, 27, 28, 29).

Guth *et al.* (30) encontraron que el EtOH concentrado causó una éxtasis total del flujo sanguíneo en la áreas dañadas de la mucosa. Ellos también reportaron que las lesiones fueron tan grandes al minuto como a la hora de la administración del EtOH. Oates y Hakkinen (9) mostraron que los sitios donde el EtOH causó hiperemia en la mucosa del estómago las venas murales estaban fuertemente contraídas y las arterias murales marcadamente dilatadas.

Diel *et al.* (31) encontraron que hay una correlación entre la extensión de la hiperemia inducida por el EtOH y la degranulación de los mastocitos; apoya esta evidencia el hecho de que la hiperemia inducida por el EtOH es fuertemente suprimida por drogas que bloquean la generación de mediadores vasoactivos que se producen en los mastocitos (32).

Estos estudios focalizados en la patogénesis del daño a la mucosa gástrica inducida por el EtOH sugieren que el evento inicial es la disrupción del endotelio

vascular resultando en un aumento de la permeabilidad vascular, formación de edema, y desprendimiento epitelial (8, 9, 10); además, otros factores han sido implicados: productos del metabolismo del ácido araquidónico, EROs, y productos de los mastocitos (26, 27, 28, 29). Kvietys *et al.* (33) concluyeron que el EtOH a bajas concentraciones (<10%) es proinflamatorio en el estómago y que los neutrófilos juegan un rol importante; mientras que los efectos citotóxicos directos del EtOH se produce a mayores concentraciones (>10%).

II. 2 INFLAMACION POR INDOMETACINA

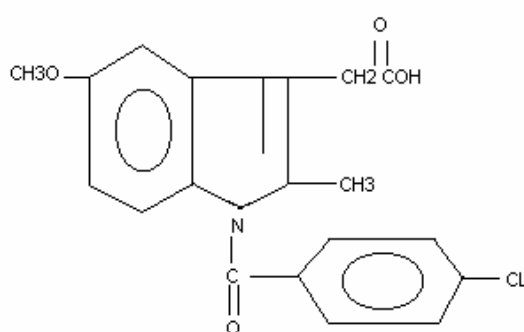


Fig 1: Estructura química de la indometacina

II.2.1. INFLAMACION GASTRICA

Es bien conocido que los AINES inducen ulceración en el estómago de humanos y animales (11, 12, 34, 35, 36, 37). Aunque el mecanismo responsable por esta acción no está claro, la habilidad de esos agentes para inhibir la síntesis de prostaglandinas gástricas es indudable y un factor importante que contribuye al daño (38); sin embargo, tampoco está claro por qué la reducción de las síntesis de prostaglandinas produce necrosis tisular.

Ashley *et al.* (11) y Gana *et al.* (12) demostraron que los AINES causaron una reducción en el flujo sanguíneo a la mucosa gástrica. Kitahora y Guth (13) notaron, además, que la reducción del flujo sanguíneo inducido por la aplicación de aspirina en el estómago de la rata fue precedido por la adherencia de los leucocitos a las paredes de los vasos en la microcirculación de la mucosa y que las lesiones hemorrágicas se forman en las regiones de perfusión reducida.

Ratas neutropénicas han mostrado una gran reducción en la extensión de la susceptibilidad al daño inducido por los AINES (39). Estas observaciones sugirieron un rol de los leucocitos circulantes en la patogénesis de la ulceración inducida por AINES.

Pihan *et al.* (27) observaron que dos enzimas antioxidantes: la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), pueden reducir significativamente la extensión del daño macroscópico de la mucosa gástrica inducida por la aspirina. Además la prevención de la adherencia de los leucocitos al endotelio vascular resulta en una reducción de la extensión del daño gástrico inducido por los AINES (40), entonces los AINES pueden estimular la adherencia de los leucocitos al endotelio vascular en la microcirculación gástrica (38, 41).

La dismutación del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por la enzima superóxido dismutasa (SOD) puede ser protectoro, aumentando la vida media del NO (30). El NO es un potente vasodilatador y puede inhibir la agregación plaquetaria, pero es rápidamente inactivado por el $O_2^{\cdot-}$ (42). El NO ha demostrado tener efectos protectores en la mucosa gástrica (43), mientras que los inhibidores de su síntesis promueven la ulceración (44).

Satoh *et al.* (45) utilizaron indometacina 20 mg/kg, por vía subcutánea para producir la inflamación gástrica en ratas; y Davies y Jamali (7) utilizaron la misma dosis pero por vía oral.

II.2.2. INFLAMACION INTESTINAL

La patogenia de la inflamación intestinal inducida por Indo aun es incierta y se han sugerido tres fases.

La primera fase podría estar representada por un **efecto bioquímico** de esta droga sobre los enterocitos. La Indo parece causar un daño específico en las mitocondrias de los enterocitos durante la absorción por desacoplamiento de la fosforilación oxidativa con reducida producción de adenosin trifosfato (ATP), esto

produce una disminución de la energía celular y causa el eflujo de calcio desde la mitocondria, lo cual produce una cascada de eventos bioquímicos secundarios incluyendo la generación de EROs. Los niveles reducidos de ATP podrían también resultar en la pérdida de las uniones intercelulares ya que su integridad está gobernada por mecanismos dependientes de esta fuente energética (46).

Se postula una segunda fase denominada **fase de transición**, que implica la etapa entre los cambios ultraestructurales y el daño macroscópico, dicha etapa está caracterizada por el incremento de la permeabilidad intestinal con pérdida de líquidos (34).

En la tercera **fase de daño intestinal** se consideran otros factores, tales como:

- a. Inhibición de la síntesis de prostaglandinas
- b. Circulación enterohepática de la Indo y secreción de ácidos biliares
- c. Circulación de neutrófilos y generación de EROs
- d. Rol de las bacterias

a. Inhibición de la síntesis de prostaglandinas

El daño intestinal inducido por Indo está estrechamente relacionado a la deficiencia de prostaglandinas protectoras, tales como PGE_1 , PGE_2 , y PGI_2 (prostaciclina) causada por la inhibición de la ciclooxigenasa (47). Sin embargo Satoh *et al.* (45) encontraron que, la administración de PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ en ratas tratadas con Indo no tuvieron significantes efectos protectores a nivel intestinal a diferencia de los efectos que se obtuvieron a nivel del estómago, en donde las prostaglandinas sí fueron protectoras. La PGE_2 es capaz de reducir significativamente la elevada permeabilidad intestinal inducida por Indo, pero no tiene efectos preventivos (46).

b. Circulación enterohepática y secreción de ácidos biliares

Reuter *et al.* (48) sugirieron que la circulación enterohepática de la Indo es de gran importancia para provocar daño intestinal. La Indo sufre circulación enterohepática, por tanto la mucosa intestinal está expuesta a la Indo y a sus metabolitos excretados en la bilis (49). Aproximadamente el 50% de la Indo es excretada del organismo. La fracción de la droga excretada por el hígado sufre circulación enterohepática. Si bien el intestino delgado de la rata no concentra la droga arriba de los niveles plasmáticos, está continuamente expuesto a la droga hasta que ésta es excretada completamente del cuerpo (49)

Asimismo, la canulación del ducto biliar y la divergencia de la bilis redujo dramáticamente el daño intestinal en un experimento realizado en ratas (50). Los efectos benéficos de la ligación del ducto biliar no son debidos simplemente a la ausencia de bilis, ya que la citotoxicidad directa de la Indo en un cultivo de células intestinales epiteliales de rata ha demostrado tener el mismo efecto en presencia o ausencia de bilis (49), además Reuter *et al.* (48) comprobaron que la Indo causó daño significativo en el intestino de rata en ausencia de productos biliares.

En 1993, Yamada *et al.* (22) encontraron que para dañar significativamente la mucosa intestinal se requiere de la exposición directa de la bilis luminal y la Indo. Estos resultados correlacionan directamente a la circulación enterohepática de la Indo en la patogénesis de las lesiones intestinales agudas.

Además, se ha determinado que los AINES que no tienen una circulación enterohepática no causan daños intestinales detectables como es el caso de la aspirina, nabumetona y nitrofenaco (48).

c. Circulación de neutrófilos y generación de EROs

Se ha propuesto que los leucocitos pueden causar el daño inducido por Indo de dos formas. Primero, la Indo provoca un aumento de la adherencia de los neutrófilos al endotelio vascular y puede reducir el flujo sanguíneo hacia la mucosa, predisponiendo al daño. Segundo, la activación de los neutrófilos puede conducir a la liberación de EROs, dañando el endotelio microvascular (51, 52, 53).

Previamente ya se había propuesto que la isquemia y la reperusión resulta en la generación de xantino oxidasa y la acumulación de neutrófilos en la mucosa intestinal, y también se había demostrado que los EROs están involucradas en el daño isquémico a la mucosa, incluyendo alteración en la permeabilidad microvascular, en el intestino delgado de los felinos (53, 54, 55).

Recientemente se ha prestado mucha atención a los EROS procedentes de los neutrófilos tales como el $O_2^{\cdot-}$ y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). El hecho de que se haya detectado una gran sobreproducción de EROs en la vena mesentérica en animales tratados con Indo es consistente con el concepto que la Indo induce estrés oxidativo mediado por los neutrófilos en las células endoteliales de los microvasos (56).

Beck *et al.* (57), utilizando ratones altamente resistentes al daño intestinal inducido por Indo, sugieren que la activación de la célula mieloide y la generación de $O_2^{\cdot-}$ pueden jugar un rol más prominente que las alteraciones del flujo sanguíneo causadas por la adhesión de los leucocitos al endotelio.

d. Rol de las bacterias

Diversos investigadores han demostrado la importancia de la flora intestinal en la formación y desarrollo de úlceras intestinales inducidas por Indo en la rata (58). Así, la prevención de la proliferación bacteriana mediante el uso de antibióticos después de la administración de Indo no sólo reduce los efectos letales de la droga sino que resulta en un cuadro ulcerativo menos severo (59). Esto demuestra que la flora intestinal juega un rol importante en el desarrollo de las úlceras.

La ulcerogenicidad de la Indo en el intestino delgado fue notablemente reducida en ratas mantenidas bajo condiciones libres de gérmenes (58). Robert *et al.* (60) encontraron que las ratas libres de gérmenes fueron resistentes a lesiones intestinales inducidas por la administración oral de Indo.

Yamada *et al.* (22) observaron un incremento de la concentración luminal de *bacillus aeróbicos* gramnegativos en el intestino delgado y colon de ratas a tres días de la aplicación de la Indo, lo cual fue asociado con el aumento de la translocación a los nódulos linfáticos mesentéricos e hígado y con la propagación de bacterias sistémicas hacia el bazo.

II.3. OXIDO NITRICO

En 1980, Furchgott y Zawadski (61) publican en la revista *Nature* un trabajo de investigación clave que marcó el inicio de la era farmacológica del NO. Ellos demostraron que el endotelio era esencial para la acción vasodilatadora muscular de la acetilcolina; la eliminación del endotelio evita el efecto relajante de la acetilcolina y más bien induce a una vasoconstricción del músculo vascular liso. La estimulación del endotelio vascular produce una sustancia con efectos vasodilatadores que en principio denominaron EDRF (endothelium derived relaxing factor = factor relajante derivado del endotelio). En 1987 y, tras mucho escepticismo científico, Ignarro *et al.* (62) identificaron dicho EDRF como NO, lo cual fue corroborado por otros investigadores (63). Este descubrimiento condujo a un mayor interés en la investigación de la biología del NO y ha influenciado en casi todas las disciplinas de las ciencias biomédicas. En 1992, Culotta y Koshland (64) editores de la revista *Science* proclamaron al NO como la “Molécula del Año”.

El NO tiene un electrón desapareado en su órbita externa, entonces es un radical libre, esto es la base para su actividad biológica, como la interacción electroquímica entre el NO y los metales, e.g. el sitio activo de la guanilato ciclasa. Sin embargo, como radical libre, su reactividad es muy débil (65). Esta pobre reactividad, combinada con su liposolubilidad, le permiten ser marcadamente difusible (66). En vivo, esta difusión puede ser en gran parte regulada por su reacción con la hemoglobina (67).

Aunque el hombre elimina nitratos (NO_3^-) se creyó que la presencia de estos compuestos en las heces y en la orina dependía única y exclusivamente de la dieta. Sin embargo en 1981, experimentos preliminares de Steven Tannenbaum *et al.* (68) demostraron que tanto el hombre como la rata, mantenidos con dietas pobres en NO_3^- seguían eliminando cantidades apreciables de los mismos. Más tarde pudo comprobarse que un hombre que padecía diarrea infecciosa excretaba por la orina una cantidad muy elevada de NO_3^- .

Fue entonces en 1988, cuando Marletta (69) estableció la relación funcional entre los macrófagos y la presencia de NO_3^- . Otros investigadores descubrieron que dichos macrófagos eran incapaces de producir NO_3^- si en el medio no había L-arginina (70, 71). Este hallazgo permitió descubrir que los macrófagos poseen una enzima específica (72), a esta enzima se la denominó NO-sintasa (NOS) (no sintetasa ya que no requiere ATP).

El NO es un potente mensajero biológico en una variedad de tejidos. Participa en varias funciones fisiológicas como: relajación del músculo liso (vasodilatación), inhibición de la agregación plaquetaria dentro de la microvasculatura, regulación de la neurotransmisión, en la defensa del sistema inmune natural y la erección peneana (6, 7, 73).

La producción de NO por las células requiere la presencia de una o más de las tres isoformas reconocidos hasta ahora de NOS (72). Dos de ellas (tipo endotelial eNOS y tipo neuronal nNOS) son expresadas constitutivamente y requieren la presencia de Ca^{++} intracelular y calmodulina. La liberación de este NO está también estimulada por la acetilcolina, adenosindifosfato (ADP), bradiquinina, sustancia P, histamina, productos derivados de las plaquetas o el estrés de rozamiento. Una vez que el NO se sintetiza en el endotelio, se distribuye al músculo liso y se une a la guanilato ciclasa, activando a la enzima para producir guanosin-mono-fosfato-cíclico (GMPc) (74). Este último mensajero intracelular produce relajación del músculo liso a través de varias acciones, pero particularmente a través de una protein-kinasa GMPc-dependiente o por inhibición

de la fosfodiesterasa, la cual comúnmente inactiva al GMPc o al adenosin-mono-fosfato cíclico (AMPc). Estos procesos ocasionan una disminución de la concentración de Ca^{++} libre intracelular y de la sensibilidad de miosina al Ca^{++} .

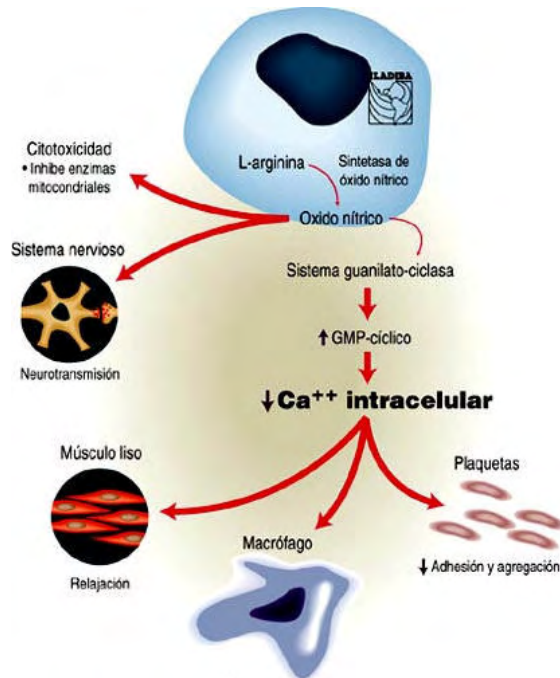


Fig 2: Funciones fisiológicas del óxido nítrico

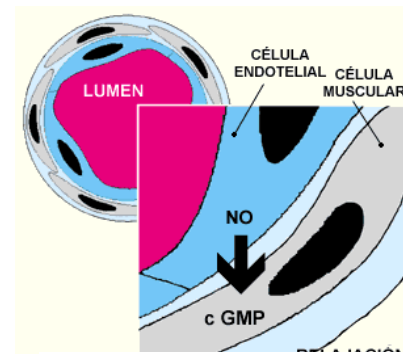


Fig 3: Vasodilatación del NO, mediado por el GMPc

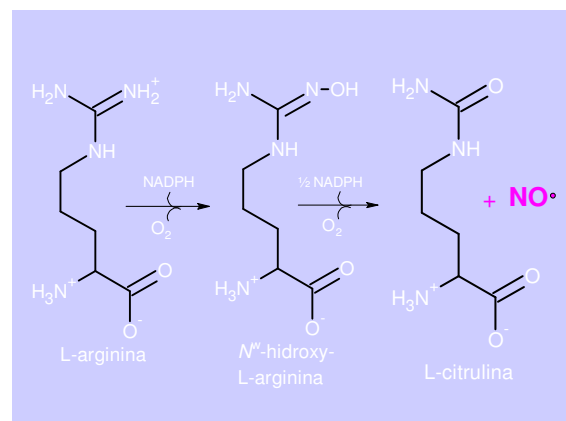
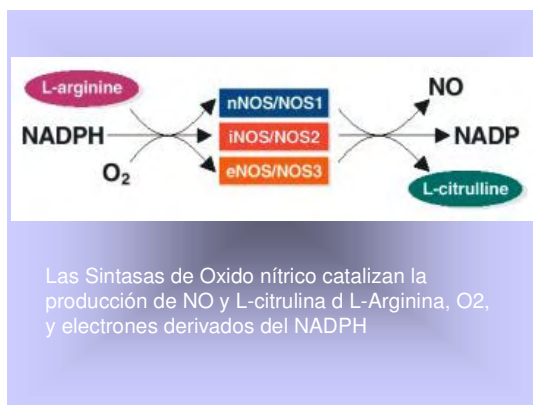


Fig 4: Biosíntesis del NO

La otra isoforma (tipo inducible iNOS, descubierta inicialmente en los macrófagos) usualmente se induce en el organismo durante la inflamación por la presencia de ciertas citoquinas inflamatorias y/o productos bacterianos. En condiciones de estímulo inflamatorio producido por la endotoxina, el factor de

necrosis tumoral ($\text{TNF}\alpha$), o la interleucina-1 (IL-1) se induce la iNOS y puede funcionar independientemente del Ca^{++} citosólico y la calmodulina (4). La regulación primaria de la iNOS es a nivel de transcripción, una vez expresada, la iNOS produce NO independientemente del calcio intracelular (3).

Cada una de las sintetasas tiene efectos patológicos selectivos, consistentes con las conocidas funciones biológicas del NO. Por ejemplo, en ratones que se les inhibe la eNOS se produce hipertensión debido al rol vasorrelajante del NO asociado a las células endoteliales (75); la inhibición de iNOS en los ratones los hace susceptibles a infecciones y muestran una pobre función defensiva de los macrófagos contra los parásitos y células tumorales (76); con inhibición de nNOS los ratones muestran estenosis pilórica hipertrófica consistente con el rol neurotransmisor inhibitorio del NO en la relajación de los músculos del esfínter pilórico (77). Ratones machos con inhibición de la nNOS muestran conducta sexual agresiva (78).

El NO tiene una reactividad limitada pero lo suficiente para reaccionar con el oxígeno produciendo NO_2^- como producto final; los intermediarios son NO_2 y N_2O_3 , altamente reactivos y especies de vida corta (6). En este contexto, la cuantificación de los metabolitos estables de la síntesis de NO, (NO_2^- y NO_3^-), en distintas situaciones fisiológicas o fisiopatológicas adquiere un papel relevante en la clínica, tanto para estudiar situaciones fisiológicas, fisiopatológicas como con finalidades terapéuticas (6, 7, 79, 80).

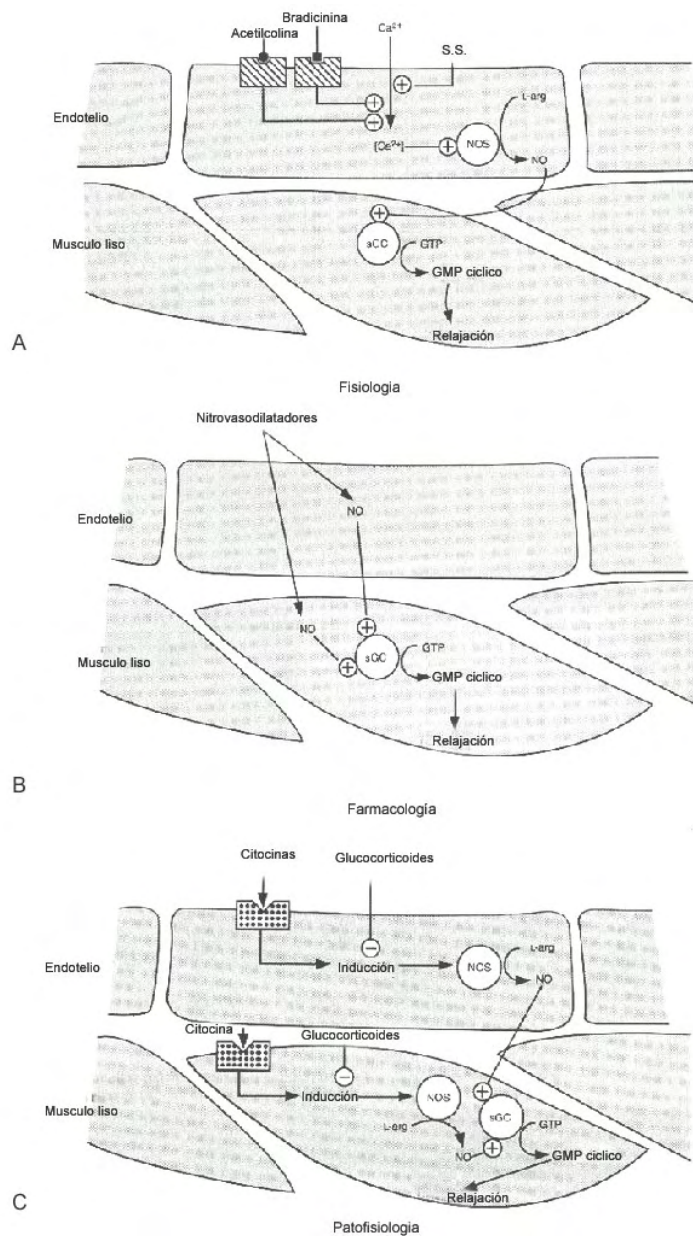


Fig 5: Mecanismos fisiológicos, farmacológicos y fisiopatológicos del NO

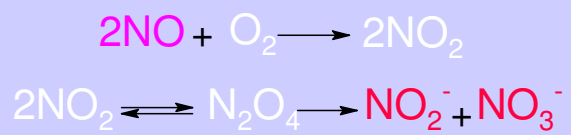


Fig 6: Autoxidación de NO

II.4. DONADORES E INHIBIDORES DEL OXIDO NITRICO

El NO es una molécula multifuncional con una rol muy importante en la relación entre las células que componen el medio microvascular. El primer efecto descubierto fue su propiedad vasodilatadora (6). El NO generado por la eNOS produce la vasodilatación por estimulación de la enzima guanilato ciclasa (GC) (fig 7) en la musculatura lisa vascular (81). Los nitrovasodilatadores y los donadores de NO como el nitroprusiato de sodio (NPS) (82) causan relajación del tejido vascular, independientemente del endotelio, por liberación directa del NO y activación del GMPc (Fig 7 y 8) en la musculatura lisa (83)

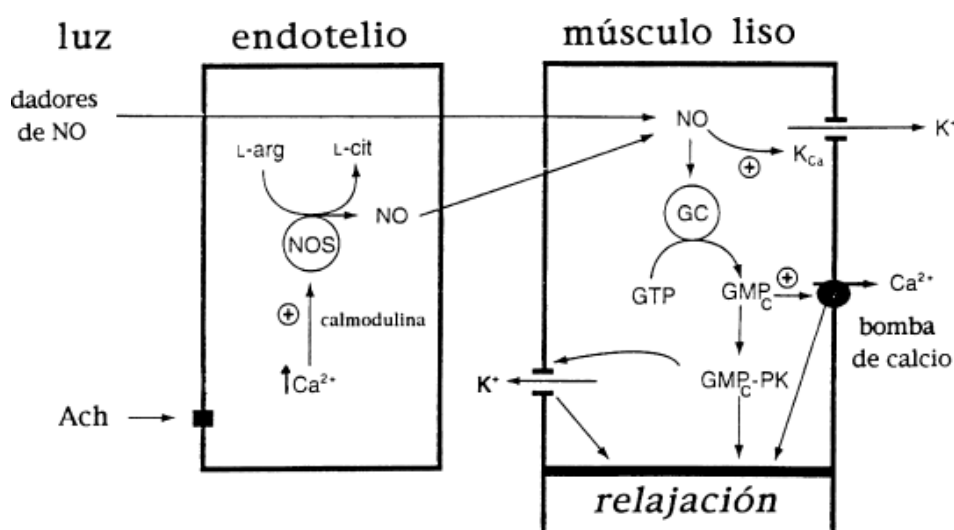


Fig 7: Diagrama que resume el mecanismo por el cual la acetilcolina (ACh) ejerce su efecto vasodilatador en el músculo liso vascular.

El receptor biológico para el NO más estudiado es la guanilato ciclasa soluble citoplasmática (GC). La activación de la GC por el NO, causa un aumento de la concentración intracelular de GMPc a partir de GTP. Se desencadena así una cascada de reacciones de activación o inactivación de determinadas enzimas por fosforilación. La figura 8 esquematiza dichas reacciones. Se han descrito 3 ligandos específicos para el GMPc con importancia neurobiológica: a) la proteinquinasa GMPc-dependiente, a la cual activa (84), b) las fosfodiesterasas activadas o inhibidas por el GMPc y c) canales iónicos de la membrana plasmática regulados directamente por el GMPc.

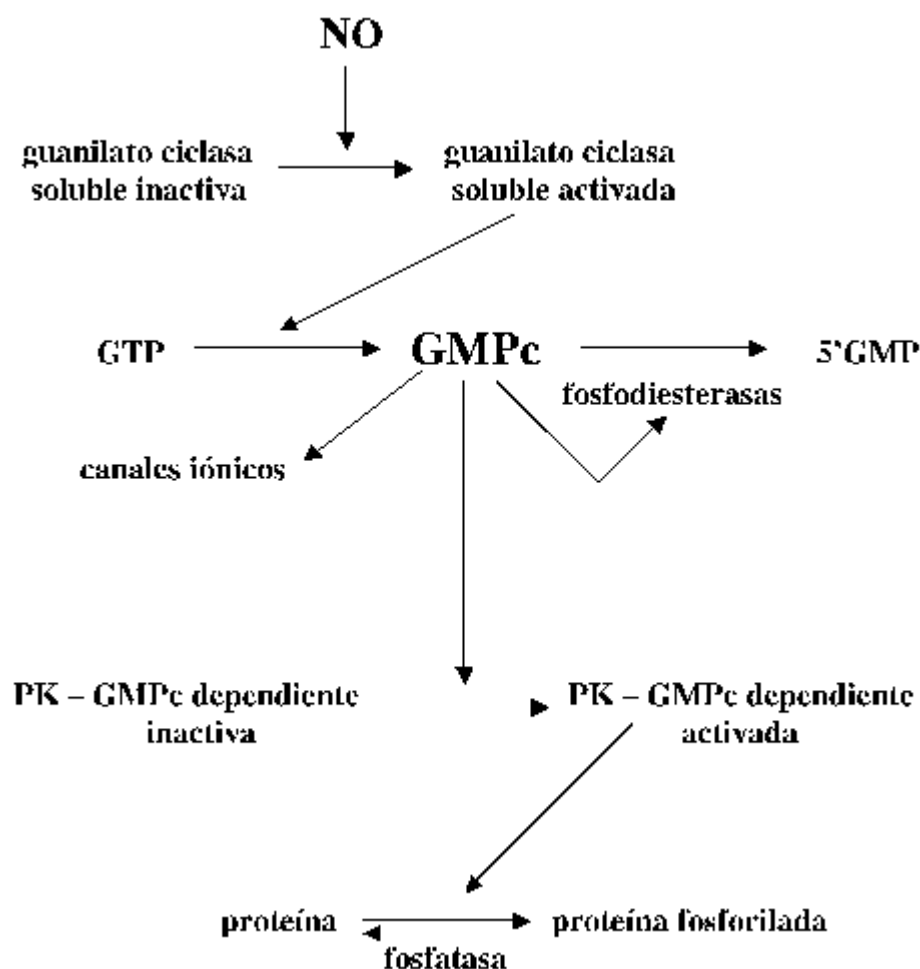


Fig 8: Acción celular del NO mediada por el GMPc.

Entonces, es posible actuar en diversos niveles del mecanismo de acción celular del NO. La administración de NO a preparados biológicos es dificultosa, por eso se utilizan donadores de NO que son sustancias que al diluirse en soluciones fisiológicas se descomponen liberando al NO del resto de la molécula. La acción de los donadores de NO puede modificarse aplicando sustancias inhibitoras o activadoras de la cascada del GMPc. Así, se han sintetizado moléculas que inhiben en forma específica la GC bloqueando la acción del NO, como por ejemplo el ODQ (1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-alquinoxalin-1-one), el azul de metileno (AM). Mientras que, análogos membrana-permeante del GMPc como el 8-Br-GMPc imitarán las acciones del gas (85).

Actualmente también se está trabajando con fármacos que inhiben el funcionamiento de las NOS, como la L-Nitroarginina (L-NA), Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) y el N-monometil arginina (L-NMMA) (86, 87).

II.5. EL METRONIDAZOL COMO DONADOR DE NO

El metronidazol (MET) se introdujo originalmente como agente oral frente a tricomonas y es eficaz también en el tratamiento de amebiasis y giardiasis. Es un compuesto de origen sintético derivado del nitroimidazol.

Su fórmula estructural es la siguiente:

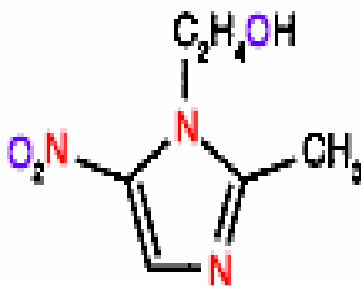


Fig 9: Estructura química del metronidazol

El mecanismo por el cual el MET protege la mucosa y atenúa la inflamación crónica no está definido. Bjarnason *et al.* (88, 89) observaron que el MET mejora la enteropatía crónica que producen los AINES en pacientes. Lichtman *et al.*, (90) encontraron que el MET elimina los bacteroides luminales, previno la inflamación hepatobiliar, y disminuyó la permeabilidad de la mucosa afectada. Además, el MET disminuyó la pérdida de sangre fecal y la permeabilidad de la mucosa en pacientes que estuvieron tomando dosis terapéuticas de AINES (91).

A pesar que el rol del MET en la enteropatía por AINES ha sido investigado (22, 92, 93), no está claro si la reducción del daño se atribuye a sus efectos antimicrobianos o a otras propiedades, como antiinflamatorio o barredor de radicales libres (22, 92). Sin embargo, existe la posibilidad de la inhibición de la adherencia de los leucocitos atribuible al efecto del grupo nitro (94). El MET ha

mostrado ser un barredor de los EROSa generadas por los neutrófilos en los sitios de la inflamación (95).

En nuestro medio, Prado (96) ha evaluado el efecto protector del MET como un potencial donador de NO en la enteritis aguda; y Rojas (97) ha demostrado que el MET es un donador de NO en el mecanismo de la actividad protectora y antiinflamatoria en la inflamación intestinal aguda experimental.

II.6. LA UÑA DE GATO (*Uncaria tomentosa* Will DC) EN EL MODELO DE INFLAMACION INTESTINAL CRONICA PROPUESTO POR YAMADA *et al.* (1993)

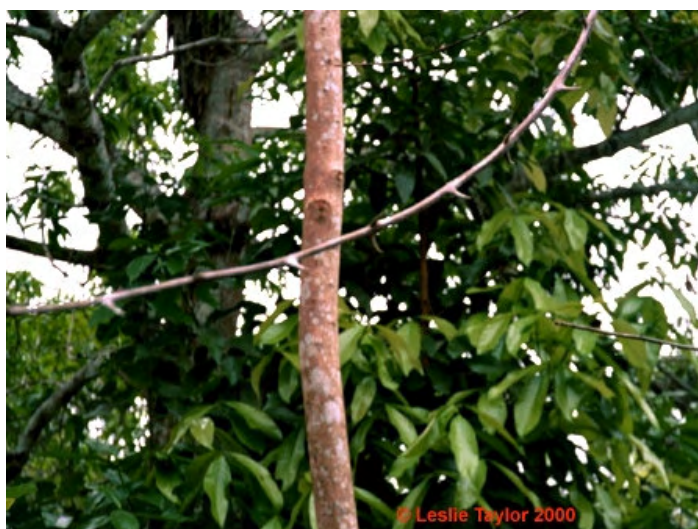


Fig 10: Hojas y corteza de *Uncaria tomentosa*, (uña de gato)

Sandoval-Chacón *et al.* (21) utilizando el modelo de inflamacion intestinal crónica propuesto por Yamada *et al.* (22) encontraron que las ratas tratadas con dos inyecciones subcutáneas (s.c.) (una diaria) de Indo produjeron ulceraciones en la mucosa en el lado mesentérico del yeyuno, y numerosos nódulos blancos localizados en el lado de la serosa del intestino, observados después de 7 días de la inyección de la Indo. Las secciones histológicas del yeyuno medio de las ratas que recibieron Indo (7.5 mg/kg) mostraron una disrupción pronunciada de la arquitectura mucosal. Con pérdida de las vellosidades y la infiltración pronunciada de células inflamatorias (21). La administración de la UG (5 mg/ml) en el agua de bebida a ratas tratadas con Indo demostró un efecto protector impresionante en la

enteritis: normalizó la arquitectura de la mucosa intestinal y atenuó la infiltración de los granulocitos (21).

Angulo y *col.* (23) han extendido este trabajo a las hojas de la UG. El propósito del trabajo fue determinar la actividad antiinflamatoria de la corteza, hojas y los alcaloides de las hojas de la UG usando el modelo de la inflamación intestinal crónica propuesto por Yamada *et al.* (22). Los extractos acuosos fueron administrados por vía oral (p.o.) diariamente (dos veces) a la dosis de 40 mg/kg del material seco. Tanto la corteza como las hojas tuvieron un efecto protector en las ratas con enteritis inducida por Indo. Siendo las hojas de UG la más efectivas y los alcaloides no presentaron actividad en este modelo experimental (23).

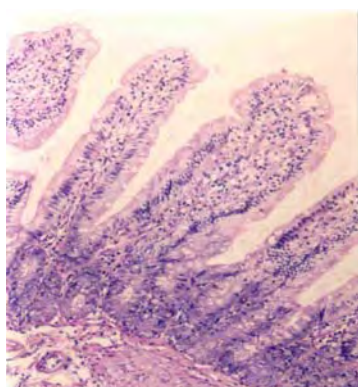


Fig 11: Epitelio normal

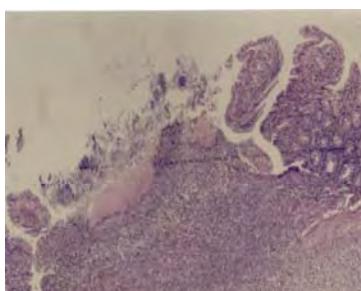


Fig 12: Epitelio destruido por la Indo. Hay una gran infiltración de neutrófilos

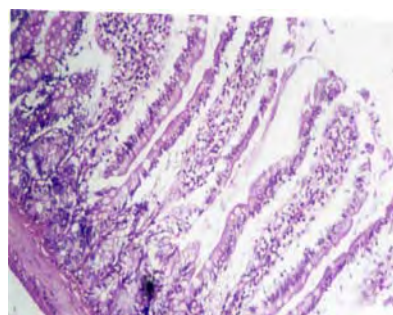


Fig 13: Epitelio normalizado. Se nota hiperplasia de las células de Lieberkhum

Recientemente Giraldo y *col.* (24) han evaluado la actividad antinitrosativa y antiinflamatoria de los flavonoides de las hojas de *Uncaria tomentosa*. Encontraron que los flavonoides totales presentes en las hojas de la UG presentan actividad antiinflamatoria en el modelo de inflamación intestinal crónica propuesta por Yamada *et al.* (22).

Sin embargo, aún no se ha establecido el rol (*in vivo*) del NO en este modelo experimental, tampoco se conoce si la actividad antiinflamatoria de la UG (*in vivo*) está mediada por el NO.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES

3.1.1 Material biológico

- ❖ Se utilizaron 620 ratas albinas macho de la cepa Holtzman de 4 meses de edad, con un peso entre 200 y 250 gramos, que fueron comprados del bioterio de la Universidad Nacional Agraria La Molina con un semana de anticipación al experimento para su adaptación a las condiciones del laboratorio de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.
- ❖ La especie vegetal en estudio corresponde a las hojas pulverizadas de *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C., producto de exportación con registro fitosanitario, proporcionadas gentilmente por el Dr. Juan de Dios Zúñiga, gerente de AGROSELVA.

3.1.2 Material de laboratorio

A. Materiales y equipos

Espectrofotómetro UV-VIS RS LaboMed, Inc.

Planímetro computarizado (Software)

B. Reactivos

Agua destilada

Etanol 96°, QP.

Indometacina, Fluka BioChemika, QP.

Carboximetilcelulosa, Scharlau, QP.

Bicarbonato de sodio, Merck, QP.

Nitrito de sodio, Merck, QP.

Acido clorhídrico, Merck, QP.

Nitroprusiato de sodio, Scharlau, QP.

Metronidazol, Sigma, QP.

Azul de metileno, J.T. Baker, QP.

L-Arginina, Fluka BioChemika, QP.

N^G-nitro-L-arginina-metil éster (L-NAME), Sigma, QP.

Formaldehído al 10%

Hidróxido de sodio 1 N

Sulfato de zinc 30%

Reactivo de Griess A: Ácido sulfanílico 1% en ácido fosfórico al 5%

Reactivo de Griess B: N-(1-Naftil)-etilenodiamina diclorhidrato al 0,1% en agua destilada

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Evidencia de la participación del óxido nítrico en la inflamación gástrica e intestinal aguda inducida en ratas (como medida del porcentaje de la lesión).

3.2.1.1 *En la inflamación gástrica aguda inducida por etanol en presencia y ausencia del bloqueo del efecto del NO* (25, 98, 99)

150 ratas de aproximadamente 200 gramos de peso fueron privadas de alimento durante 24 horas previo al experimento, pero no de agua (*ad libitum*),. Luego fueron divididas en dos grupos: control (GC) y tratados (GT) con lotes de 15 animales cada grupo, a los cuales se les administraron las siguientes sustancias:

Lote 1: Agua destilada

Lote 2: Agua destilada + AM

Lote 3: Agua destilada + L-NAME

Lote 4: NPS

Lote 5: NIT

Previamente, se preparó el NIT al 0.50% en HCl 0.1 N durante 30 minutos (98), la dosis utilizada fue de 20 mg/Kg. El NPS 0.025% a la dosis de 1mg/kg (99) fue administrado por sonda orogástrica (s.o.) en un volumen de 4 ml/Kg, de la misma forma fue administrado el NIT y el agua destilada. Simultáneamente se administró por vía intraperitoneal (i.p.) el azul de metileno (AM) 0.20% a la dosis de 4 mg/kg, y N^G-nitro-L-

arginina-metil éster (L-NAME) 2.50%, 50 mg/Kg, en un volumen equivalente a 2 ml/kg (100). Las ratas de los lotes 1, 4 y 5 recibieron agua destilada por vía i.p. (2 ml/Kg).

Después de 30 minutos de la administración de las sustancias, al grupo GC se le administró por sonda orogástrica (s.o.) agua destilada a la dosis de 1 ml/100 g de peso. Al grupo GT se procedió a inducirles la inflamación gástrica aguda mediante la administración de EtOH70° por sonda orogástrica a la dosis de 1 ml/100 g de peso (24, 8, 28), de acuerdo al siguiente esquema:

Lote 1: Agua destilada + etanol 70° (EtOH70°)

Lote 2: Agua destilada + AM + EtOH70° (AM)

Lote 3: Agua destilada + L-NAME + EtOH70° (L-NAME)

Lote 4: NPS + EtOH70° (NPS)

Lote 5: NIT + EtOH70° (NIT)

Después de 2 horas, las ratas fueron sacrificadas por decapitación y los estómagos removidos y abiertos a lo largo de la curvatura mayor. Se lavaron con suero fisiológico y fueron fotografiados. La magnitud del daño hemorrágico fue procesado en un planímetro computarizado (101, 102) por un patólogo que desconocía del tratamiento. La extensión del daño gástrico fue expresado como un porcentaje del área glandular total.

3.2.1.2 Efecto protector del NO en la inflamación gástrica aguda inducida por indometacina

60 ratas de aproximadamente 200 gramos de peso vivo fueron privadas de alimento (ayunas), pero no de agua (*ad libitum*), durante 24 horas previos al experimento. Luego fueron divididas en lotes de 15 animales cada uno, a los que se les administraron las siguientes sustancias:

Lote 1: Agua destilada + carboximetilcelulosa (vehículo)

Lote 2: Agua destilada + indometacina (Indo)

Lote 3: Nitrito de sodio + indometacina (NIT)

Lote 4: Nitrito de sodio + azul de metileno + indometacina (NIT+AM)

El agua destilada y el NIT fueron administrados mediante sonda orogástrica (s.o.) 30 minutos antes de la indometacina y la carboximetilcelulosa. La Indo 0.50% (en carboximetilcelulosa al 2%) fue administrada a la dosis de 20 mg/Kg (7) mediante una

s.o., los volúmenes fueron de 4 ml/Kg. El AM 0.20% fue administrado a la dosis de 4 mg/kg por vía i.p. al mismo tiempo que la Indo. Las ratas de los lotes 1, 2 y 3 recibieron agua destilada (2 ml/Kg) por vía i.p. al mismo tiempo que la Indo.

Después de 3 horas, las ratas fueron sacrificadas por decapitación y los estómagos removidos y abiertos a lo largo de la curvatura mayor. La severidad del daño gástrico fue medido por un patólogo que no conocía de los tratamientos. El índice de úlceras fue expresado como la suma en mm del total de las longitudes del área de la lesiones erosivas individuales medidos bajo un microscopio calibrado (103, 104).

3.2.1.3 Efecto protector del NO en la inflamación intestinal aguda inducida por indometacina

Para este experimento hemos utilizado el modelo experimental propuesto por Ramos Anicama, Dunia en 2003 (105):

90 ratas de aproximadamente 250 gramos de peso vivo, mantenidas con alimento y agua *ad libitum* fueron divididas en lotes de 15 animales cada uno; a las 8 am se les administraron por vía i.p. las siguientes sustancias:

Lote 1: Agua destilada

Lote 2: Azul de metileno

Lote 3: N^G -nitro-L-arginina-metil éster

Lote 4: Agua destilada

Lote 5: Azul de metileno

Lote 6: N^G -nitro-L-arginina-metil éster

Después de una hora, se procedió a administrar por vía subcutánea (s.c.) indometacina 0.75% (15 mg/Kg, 2 ml/Kg) (105) disuelto en bicarbonato de sodio 5% a los lotes 4, 5 y 6. Las ratas de los lotes 1, 2 y 3 fueron administradas con bicarbonato de sodio (2 ml/Kg) por vía s.c.

Lote 1: Agua destilada + bicarbonato de sodio (Control)

Lote 2: Azul de metileno + bicarbonato de sodio (Control)

Lote 3: N^G -nitro-L-arginina-metil éster + bicarbonato de sodio (Control)

Lote 4: Agua destilada + indometacina (Indo)

Lote 5: Azul de metileno + indometacina (AM)

Lote 6: N^G -nitro-L-arginina-metil éster + indometacina (L-NAME)

Después de 6 horas (2 pm) de la primera administración se aplica otra dosis de AM y L-NAME.

Las ratas fueron sacrificadas a las 48 horas de la administración de la Indo. Se procedió a abrir el abdomen a través de una incisión en la línea media del abdomen, para extraer el intestino delgado y separar una porción del yeyuno medio. El daño macroscópico fue cuantificado en una sección del yeyuno medio de 10 cm de longitud. El segmento del yeyuno fue enjuagado con suero fisiológico y abierto longitudinalmente por el lado antimesentérico. Cada sección fue codificado y fotografiado; las fotografías fueron usadas para la determinación planimétrica del área lesionada (106). La determinación fue realizada por un patólogo que desconocía del tratamiento.

3.2.2 Efecto protector de algunos donadores de óxido nítrico en la inflamación gástrica e intestinal aguda

3.2.2.1 *En la inflamación gástrica aguda inducida por etanol*

Previamente, se preparó el NIT al 0.50% en HCl 0.1 N durante 30 minutos (98), la dosis utilizada fue de 20 mg/Kg.

El NPS 0.025% a la dosis de 1 mg/Kg (101) fue administrado por sonda orogástrica (s.o.) en un volumen de 4 ml/kg; de la misma forma fue administrado el NIT, el agua destilada y el metronidazol (MET) (98, 99) 1.25% a la dosis de 50 mg/Kg.

Después de 30 minutos, la inflamación fue inducida por etanol de 96° a la dosis de 1 ml/100 g de peso (24), a 60 ratas divididas en lotes de 15 c/u, de acuerdo al siguiente esquema

Lote 1: Agua destilada + EtOH 96° (EtOH)

Lote 2: NIT + EtOH 96° (NIT)

Lote 3: NPS + EtOH 96° (NPS)

Lote 4: MET + EtOH 96° (MET)

Después de 2 horas, las ratas fueron sacrificadas por decapitación y los estómagos removidos y abiertos a lo largo de la curvatura mayor. Se lavaron con suero fisiológico y fueron fotografiados. La magnitud del daño hemorrágico fue procesado en un

planímetro computarizado (101, 102) por un patólogo que desconocía del tratamiento. La extensión del daño gástrico fue expresado como un porcentaje del área glandular total.

3.2.2.2 En la inflamación intestinal aguda inducida por indometacina

120 ratas de aproximadamente 250 gramos de peso vivo, mantenidas con alimento y agua *ad libitum* fueron divididas en lotes de 15 animales cada uno; a las 8 am se les administraron por vía i.p. las siguientes sustancias:

Lote 1: Agua destilada

Lote 2: MET

Lote 3: L-NAME

Lote 4: MET + L-NAME

Lote 5: Agua destilada

Lote 6: MET

Lote 7: L-NAME

Lote 8: MET + L-NAME

La dosis de MET 2.50% fue de 50 mg/Kg en un volumen de 2 ml/Kg, la misma dosis fue para el L-NAME.

Después de una hora, se procedió a administrar por vía subcutánea (s.c.) Indo 0.75% (2 ml/Kg) disuelto en bicarbonato de sodio 5% (105) a los lotes 5, 6, 7 y 8. Las ratas de los lotes 1, 2, 3 y 4 fueron administradas con bicarbonato de sodio (2 ml/Kg) por vía s.c.

Lote 1: Agua destilada + bicarbonato de sodio (Control)

Lote 2: MET + bicarbonato de sodio (Control)

Lote 3: L-NAME + bicarbonato de sodio (Control)

Lote 4: MET+ L-NAME + bicarbonato de sodio (Control)

Lote 5: Agua destilada + Indo (Indo)

Lote 6: MET + Indo (MET)

Lote 7: L-NAME + Indo (L-NAME)

Lote 8: MET + L-NAME + Indo (L-NAME + MET)

Después de 6 horas (2 pm) de la primera administración se aplica otra dosis de MET y L-NAME, de acuerdo al esquema en ensayo.

Las ratas fueron sacrificadas a las 48 horas de la administración de la Indo. Se procedió a abrir el abdomen a través de una incisión en la línea media del abdomen, para extraer el intestino delgado y separar una porción del yeyuno medio. El daño macroscópico fue cuantificado en una sección del yeyuno medio de 10 cm de longitud. El segmento del yeyuno fue enjuagado con suero fisiológico y abierto longitudinalmente por el lado antimesentérico. Cada sección fue codificado y fotografiado; las fotografías fueron usadas para la determinación planimétrica del área lesionada (106). La determinación fue realizada por un patólogo que desconocía del tratamiento.

3.2.3 Evidencia de la participación del óxido nítrico en la inflamación intestinal crónica experimental

Para este experimento se utilizó el modelo de inflamación intestinal crónica propuesta por Yamada *et al.* en 1993 (22). 140 ratas de aproximadamente 250 g fueron adaptadas a las condiciones del laboratorio durante 5 días antes del experimento, con agua y comida *ad libitum*. La inflamación intestinal crónica fue inducida durante 7 días mediante dos inyecciones s.c. de indometacina (7.5 mg/Kg) diariamente a las 9 a.m. con un intervalo de 24 horas (22). Al grupo control se le administró s.c. el vehículo (bicarbonato de sodio 5%).

Previamente, la Indo fue disuelta a 37°C en bicarbonato de sodio 5%; la concentración de la Indo fue 0.375% y se administró a la dosis de 2 ml/Kg.

El primer día de la administración es considerado como el día 0. A partir del día 1 hasta el 7, se procedió a sacrificar (por decapitación) 10 ratas del grupo control y 10 ratas del tratado con Indo, la sangre fue recogida (en tubos heparinizados) y centrifugada a 3, 500 rpm durante 10 minutos. El plasma fue desproteinizado en medio alcalino (107) de acuerdo a las siguientes proporciones:

Plasma, 800 µL

Agua destilada, 600 µL

Hidróxido de sodio 1N, 100 µL

Sulfato de zinc 30%, 100 µL

Después de la precipitación se centrifuga a 3, 500 rpm durante 10 minutos. La muestra esta diluída al medio (1/2).

3.2.3.1 Determinación del óxido nítrico

El NO fue medido indirectamente como su producto final: nitrito (NO_2^-), usando el reactivo de Griess como ha sido descrito ampliamente (108-111). Un volumen del plasma desproteinizado fue mezclado con un volumen similar del reactivo de Griess (ácido sulfanílico 1% en ácido fosfórico al 5%, y N-(1-Naftil)-etilenodiamina diclorhidrato al 0,1% en agua); la muestra está diluida al cuarto (1/4). Después de 10 minutos se hicieron las lecturas en un espectrofotómetro digital LaboMed a 546 nm y referidas a la absorbancia de soluciones estandar de nitrito de sodio (0.5, 1.25, 2.5, 5, y 12.5 $\mu\text{moles/ml}$) tratadas de la misma manera con el reactivo de Griess. Los resultados se multiplican por 4 para referirlos a la concentración original.

3.2.4 Evaluación del efecto protector de las hojas de *Uncaria tomentosa* en el modelo de inflamación intestinal crónica propuesto por Yamada et al. (1993)

Los extractos se prepararon hirviendo con agua destilada las hojas pulverizadas de la *Uncaria tomentosa* (1 g/100 ml) durante 15 minutos y se deja enfriar a temperatura ambiente durante toda la noche (UGH). Al día siguiente se filtra, y se mantiene refrigerada para ser usada durante todo el experimento.

La inflamación intestinal crónica fue inducida durante 7 días mediante dos inyecciones s.c. de indometacina (7.5 mg/kg) diariamente a las 9 a.m. con un intervalo de 24 horas (22), Al grupo control se le administró s.c. el vehículo (bicarbonato de sodio 5%).

A partir del día 1 hasta el 7, se procedió a administrar los extractos de UGH mediante sonda orogástrica (9 am y 3 pm) a la dosis de 40 mg/Kg. El tratamiento fue para ambos grupos, el tratado con Indo y grupo control.

Las determinaciones de los niveles de NO se hicieron de la misma manera que la experiencia anterior, desde el día 1 hasta el 7.

3.3 ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados son expresados como medias \pm D.E. Las diferencias estadísticas fueron identificadas utilizando el análisis de varianza (ANOVA), la comparación de las medias se hizo con el Test de Student, usando el software SPSS versión 14. Una probabilidad $p < 0.05$ fue considera significativa.

IV. RESULTADOS

1. Evidencia del efecto protector del óxido nítrico en la inflamación gástrica aguda inducida por etanol



Fig 14: Control

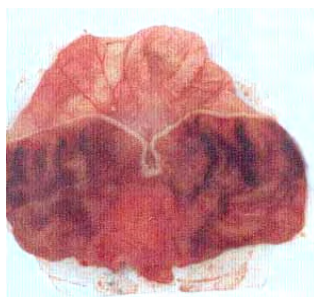


Fig 15: Etanol 70°



Fig 16: Azul de metileno



Fig 17: L-NAME

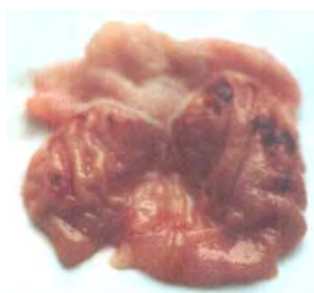


Fig 18: Nitrito de sodio



Fig 19: Nitroprusiato de sodio

No se ha observado hiperemia en los estómagos de las ratas que fueron usadas como control (Fig 14). Por el contrario, en las ratas tratadas con EtOH se observa un daño gástrico severo cuya magnitud depende de la cantidad y la concentración del EtOH (Fig 15). Dependiendo de tiempo que transcurre desde la administración del EtOH se puede apreciar que en la superficie de la mucosa se forman líneas rojas u oscuras en forma de bandas largas, de aproximadamente 1-10 mm de longitud por 1-3 mm de ancho, generalmente están paralelas al eje longitudinal del estómago (Fig 15). La lesión se localiza mayormente en el *corpus*

(la porción del estómago que secreta ácido y pepsina); el *antrum* es menos afectado. Las lesiones groseras no se desarrollaron en el estómago anterior (porción blanca superior del estómago), que es la parte no secretoria cubierta con epitelio escamoso.

Al parecer las lesiones son necróticas hacia el interior de la mucosa, lo cual involucra la superficie del epitelio, la región del mucus, y las células parietales. Dependiendo de la concentración del EtOH, la necrosis puede involucrar a toda la mucosa.

Como podemos apreciar en la Fig 15, y de acuerdo al método de medición utilizado (103, 104); el EtOH70° produce, en promedio, un 59% de daño al estómago de las ratas; mientras que el AM aumentó el daño al 91% ($p<0.05$), algo similar ocurrió con el L-NAME (89%) ($p<0.05$). El NPS previno significativamente la lesión, la cual resultó sólo en un 20% ($p<0.02$), y el NIT en un 10% ($p<0.02$). Esto se relaciona con el hecho de que el AM, al inhibir el GMPc, aumenta aun más la vasoconstricción (112); lo contrario sucede con la acción del NIT, el cual al generar NO (100) previene la isquemia gástrica (101).

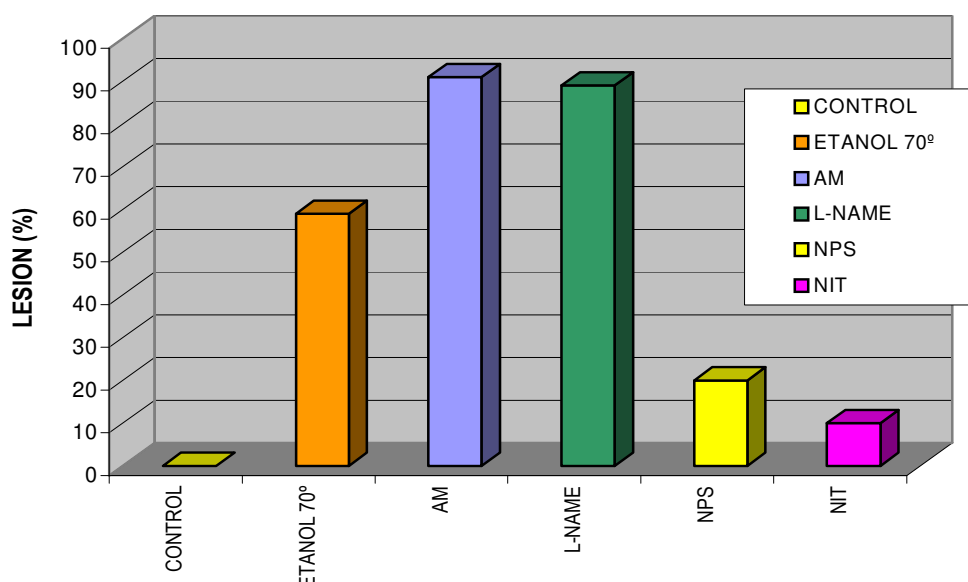


Fig 21: Evidencia del efecto protector del óxido nítrico en la inflamación gástrica aguda inducida por etanol 70°

2. Evidencia del efecto protector del óxido nítrico en la inflamación gástrica aguda inducida por indometacina

Nosotros hemos encontrado que en las ratas que estuvieron privadas de alimento 24 horas antes del experimento las erosiones lineales se presentaron en el *corpus*.

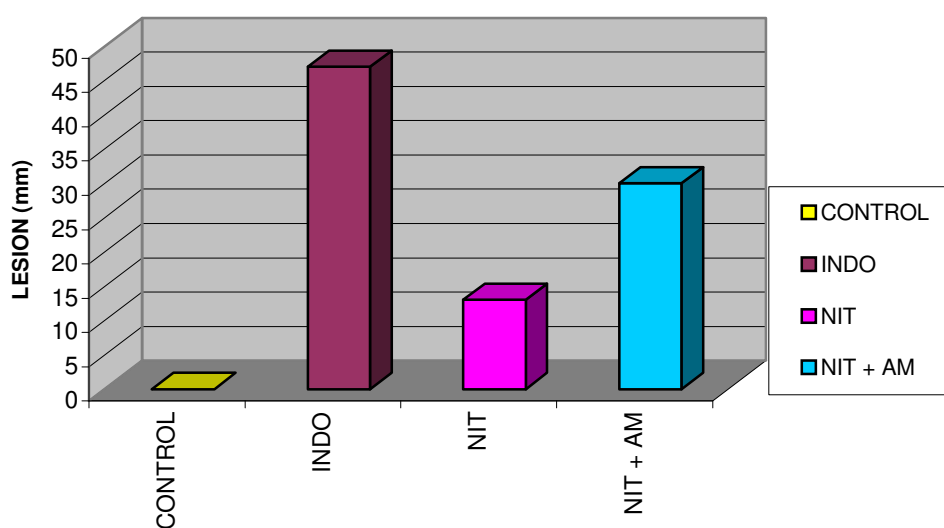


Fig 22: Evidencia del efecto protector del óxido nítrico en la inflamación gástrica aguda inducida indometacina

3. Evidencia del efecto protector del óxido nítrico en la inflamación intestinal aguda inducida por indometacina



Fig 23: Control



Fig 24: Indometacina



Fig 25: Indometacina + azul de metileno

Las lesiones macroscópicas producidas por la indometacina se caracterizan por el engrosamiento del intestino y úlceras lineales que se ubicaron preferentemente en el lado mesentérico del yeyuno medio y distal; hay zonas hiperémicas con áreas necróticas (fig 24), lo cual se agrava con el AM o L-NAME (Fig 25)

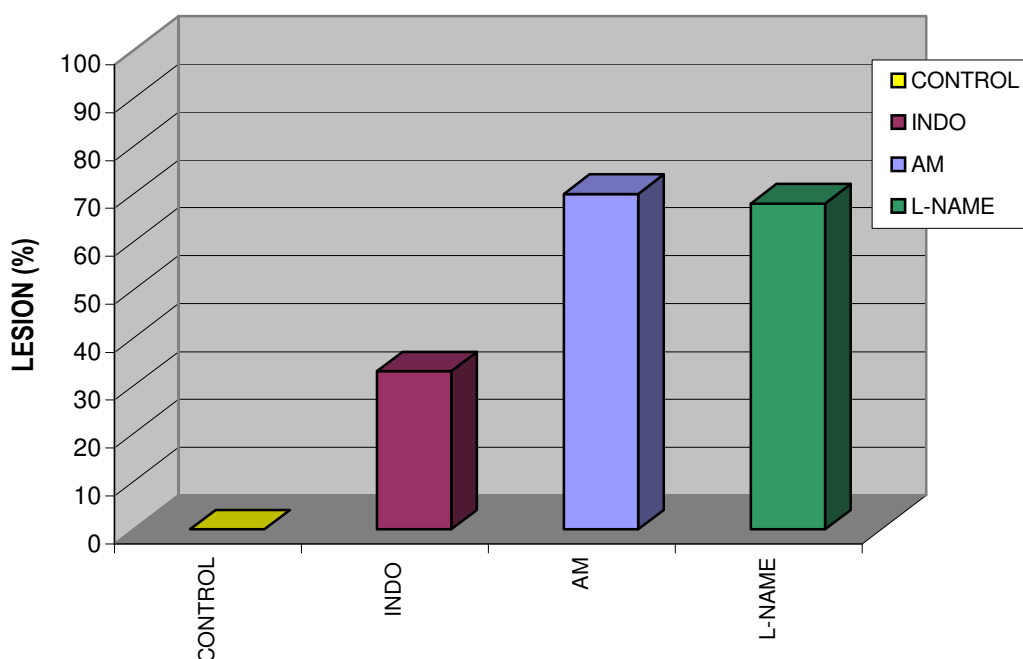


Fig 26: Evidencia del efecto protector del óxido nítrico en la inflamación intestinal aguda inducida por indometacina

4. Evidencia del efecto protector de donadores del óxido nítrico: nitrito, nitroprusiato y metronidazol en la inflamación gástrica aguda inducida por EtOH 96°



Fig 27: EtOH96°



Fig 28: NIT



Fig 29: NPS



Fig 30: MET

En este caso, se observa un daño mayor de la mucosa en comparación con el EtOH 70° (96% vs 59%) ($p < 0.02$) (Fig 21, 31), lo cual está relacionado directamente con concentración del etanol. Nuevamente, se pone en evidencia que los donadores de NO previenen el “shock” hemorrágico inducido por EtOH 96° ($p < 0.02$). Llama la atención el gran efecto protector del MET, lo cual confirma los resultados de Prado (96) y Rojas (97).

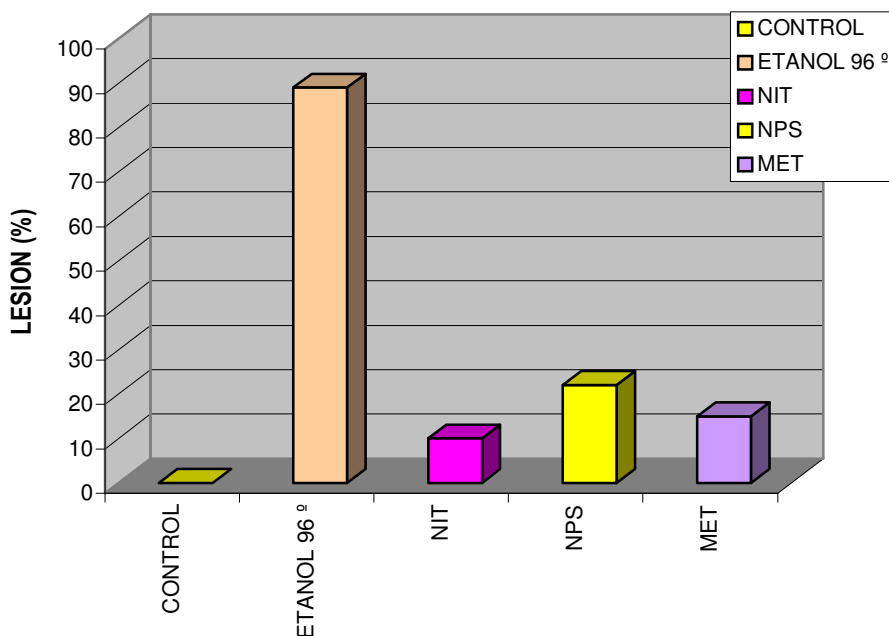


Fig 31: Evidencia del efecto protector de algunos donadores de óxido nítrico en la inflamación gástrica aguda inducida por etanol 96°

5. Evidencia del efecto protector del donador metronidazol en la inflamación intestinal aguda inducida por Indo

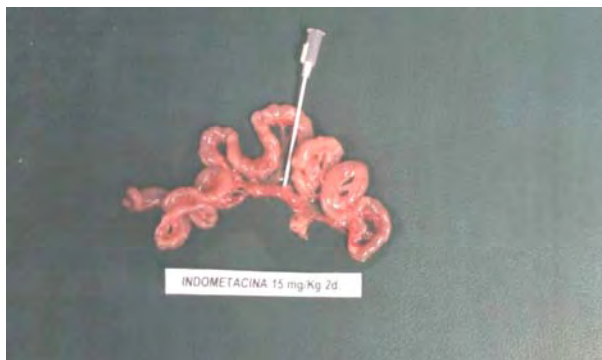


Fig 32: Mesenterio de las ratas con INDO



Fig 33: Mesenterio de las ratas con MET



Fig 34: Control



Fig 35: Indometacina



Fig 36: L-NAME



Fig 37: Metronidazol



Fig 38: L-NAME + Metronidazol

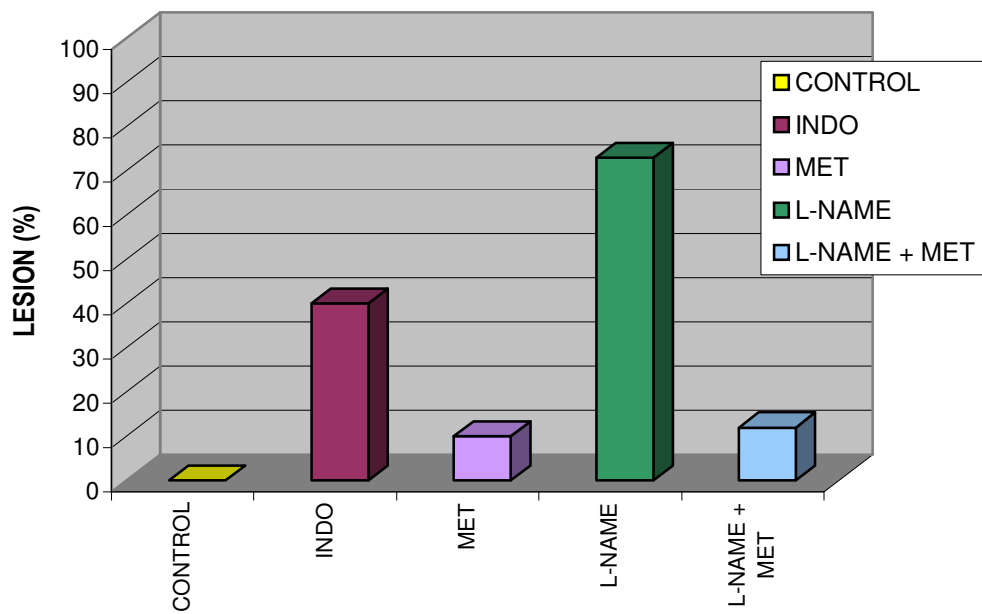


Fig 39: Evidencia del efector protector de algunos donadores de óxido nítrico en la inflamación intestinal aguda inducida por indometacina

6. Evidencia de la participación del óxido nítrico en la inflamación intestinal crónica experimental

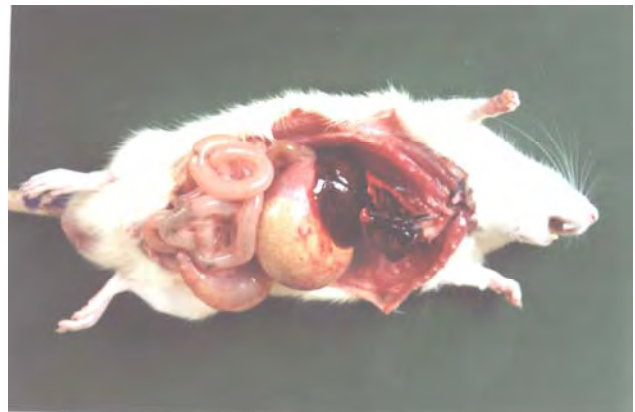


Fig 40: Apertura de la cavidad abdominal para separar el intestino delgado, es un método invasivo



Fig 41: Control



Fig 42: Indo, día 1



Fig 43: Indo, día 2



Fig 44: Indo, día 3



Fig 45: Indo, día 4



Fig 46: Indo, día 5



Fig 47: Indo, día 6



Fig 48: Indo, día 7

Se observó que las lesiones por indometacina aparecen desde el primer día del experimento; es decir a las 24 horas después de la administración de la primera dosis de la Indo, el yeyuno medio se muestra hiperémico aunque todavía no dilatado. Es a partir de segundo día (después de la segunda administración de la indometacina) que se nota que el intestino ha aumentado de tamaño, está dilatado y edematoso con algunas zonas necróticas. La necrosis aumenta al tercer y cuarto día; después se nota lenta regresión a partir del quinto día.

Estas observaciones macroscópicas se correlacionan directamente con los niveles plasmáticos de NO encontrados en las ratas sacrificadas. Como se puede apreciar en la figura 49, la máxima concentración del NO fue al cuarto día, luego disminuye progresivamente. Estos resultados se están reportando por primera vez, debido a que se trata de un modelo de inflamación crónica, el NO se debe haber producido por enzima inducible iNOS (22).

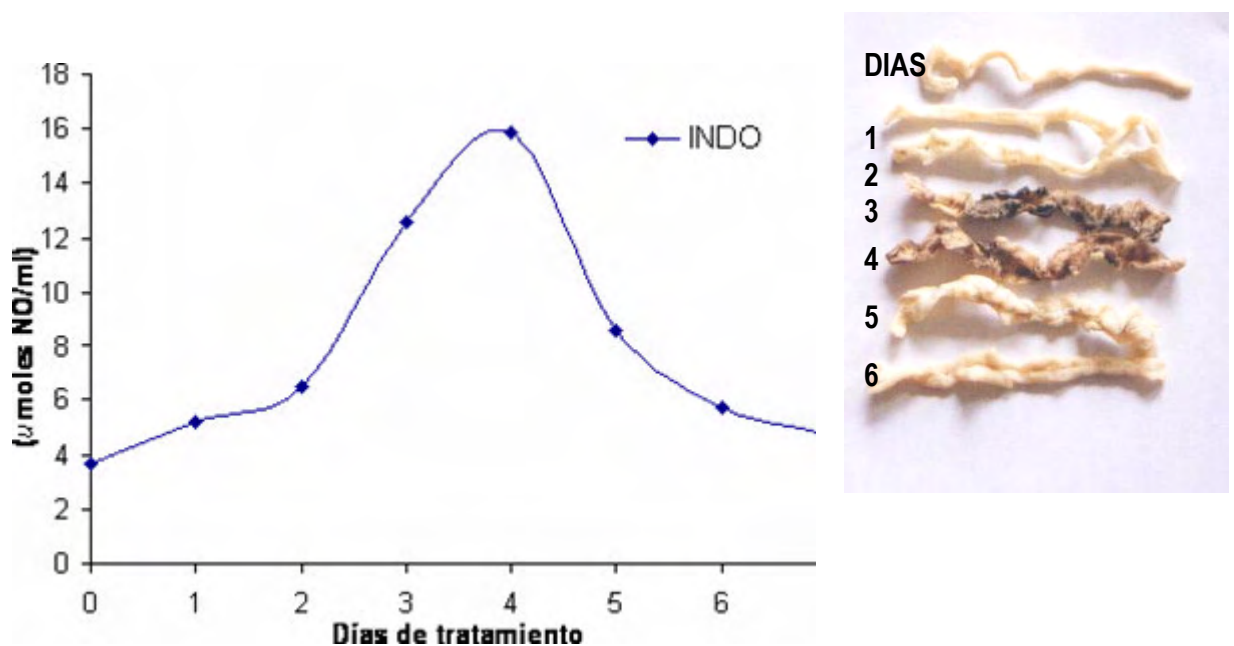


Fig 49: Correlación entre los niveles plasmáticos de óxido nítrico y la inflamación intestinal crónica de acuerdo con el modelo propuesto por Yamada *et al.*, (1993).

7. Evaluación del efecto protector de las hojas de *Uncaria tomentosa* en el modelo de inflamación intestinal crónica propuesto por Yamada et al. (1993)



Fig 50: Control



Fig 51: Indo, día 4



Fig 52: Hojas de *Uncaria tomentosa*

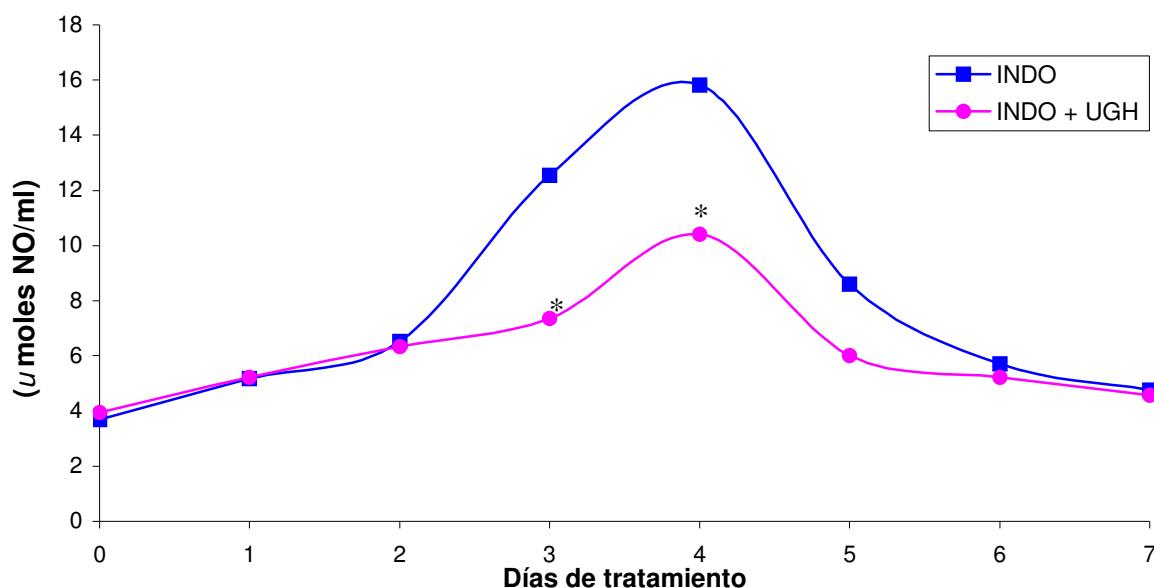


Fig 53: Efecto del extracto acuoso de las hojas de *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato) sobre los niveles plasmáticos de óxido nítrico en ratas con inflamación intestinal crónica en el modelo propuesto por Yamada et al. (1993). * $p < 0.05$.

V. DISCUSION

En nuestro medio se viene utilizando el modelo propuesto por Robert *et al.* (25) para inducir la inflamación gástrica aguda, el que consiste en la administración oral de EtOH a ratas después de 24 horas de ayuno. A pesar que se conocen varios eventos fisiopatológicos implicados en este daño gástrico (8-10); no hay estudios que indiquen específicamente la participación del NO en este modelo experimental. Szabo *et al.* (1985) fueron los primeros en sugerir que el daño endotelial precede y puede ser responsable para el desarrollo de la hemorragia inducida por el etanol en ratas (10). A la luz de los conocimientos actuales, se sabe que el endotelio es vital para controlar el tono vascular mediante la elaboración de sustancias vasodilatadoras y citoprotectivas como el NO (67) y prostaglandina (30); lo cual nos indujo a proponer la hipótesis de que el NO también participa en este modelo experimental,.

A pesar que varias prostaglandinas protegen la mucosa gástrica contra la necrosis que produce el etanol; está demostrado que las prostaglandinas que protegen de las erosiones hemorrágicas de la mucosa gástrica no protegen contra el daño a las células epiteliales de la superficie (117). Una razón más que justificó investigar, ¿cuál es el rol que cumple el NO es esta inflamación aguda?

De acuerdo a nuestros resultados, el hecho que la N^G -nitro-L-arginina-metil éster aumenta significativamente el daño gástrico producido por el EtOH70° (Fig 17), involucra la participación de la enzima constitutiva que produce NO (endotelial). El efecto protector del NPS, un donador de NO, refuerza nuestra afirmación de que el NO participa en esta injuria y concuerda con los resultados obtenidos por Andrews *et al.* (118). El efecto del NIT (Fig 18) confirma definitivamente que el NO protege del daño gástrico inducido por el EtOH. Como se sabe, la formación de NO a partir del NIT en estómago está ampliamente documentado (119, 120); Aoki *et al.* (98) fueron los primeros en usar al NIT como un donador de NO, estos investigadores encontraron que el NIT tenía efecto protector en la inflamación intestinal. En este experimento, también se pone en evidencia el efecto antiinflamatorio del NO en este modelo experimental.

El hecho de que el AM, aumenta significativamente el daño gástrico causado por el EtOH70° (Fig 16), indica la importancia que tiene la modificación del tono vascular de los vasos sanguíneos en la microcirculación gástrica; lo cual fue observado por Guth *et al.* en 1984 (30). Este efecto se relaciona con la propiedad bioquímica importante del NO,

la activación de la GMPc soluble y la elevación de los niveles tisulares de GMPc y por este mecanismo se produce la relajación de la musculatura lisa vascular (121). Entonces, debido a su efecto vasodilatador el NO (122) actúa como protector frente a esta injuria en el estómago de la rata.

Cuando se utilizó una mayor concentración de etanol (EtOH96^o) se encontró que el daño gástrico también fue mayor (Fig 27); en este experimento, nuevamente el NIT produjo un gran efecto protector (Fig 28). El NPS también redujo significativamente el área lesionada, esto confirma el efecto del NO y su acción sobre la GC (101); y concuerda con Andrews *et al.* (118), quienes demostraron que el NPS produce una reducción en la severidad del daño gástrico inducido por isquemia-reperfusión. Previamente, Pihan *et al.* (29) propusieron en 1986 que la éxtasis inicial en microcirculación es un evento clave en el daño a la mucosa gástrica causada por el etanol. Nos ha llamado poderosamente la atención el gran efecto protector del MET (Fig 30), toda vez que dentro de la literatura científica no se menciona como donador de NO. Nuestros resultados con este donador confirman los trabajos de Prado (96) y Rojas (97).

Todo lo anterior pone en evidencia a la participación del NO en este modelo experimental de inflamación gástrica aguda inducida por EtOH y su efecto protector es debido a su actividad vasodilatadora; esto concuerda ampliamente con otros investigadores (33, 123, 124). Esto no excluye que su rol protector se deba a otras acciones del NO, como por ejemplo a su actividad antioxidante y barredora de los radicales libres del oxígeno (33, 125, 126).

Algo similar ocurre con la inflamación gástrica aguda inducida por indometacina, de acuerdo al modelo propuesto por Davies y Jamali (7) en 1997. Aquí, una vez más se evidencia el gran efecto protector del NIT (Fig 22). Como se sabe, en la patogénesis de la ulceración gástrica inducida por los antiinflamatorios no esteroideos (AINES), se ha encontrado que un evento clave es la adherencia de los neutrófilos al endotelio vascular (127). El NO es un importante modulador de la adherencia de los neutrófilos (128). También se sabe que, en el estómago el NO exhibe varias acciones de las prostaglandinas, tales como la estimulación del mucus (129) y el mantenimiento del flujo sanguíneo a la mucosa (130). Hemos encontrado que las ratas que además del NIT recibieron AM, la actividad antiinflamatoria se reduce dramáticamente (Fig 22), esto se relaciona con la actividad moduladora del tono vascular que produce el NO (112) el cual

es mediado por el GMc (121). Los resultados de nuestro experimento ponen en evidencia el rol protector del NO, mediante su acción vasodilatadora, en la inflamación gástrica aguda inducida por Indo y concuerda con otros investigadores (123, 128, 94). Esto no excluye la participación de su actividad antioxidante y barredora de los radicales libres de oxígeno (24, 126, 131, 132).

En el intestino delgado, el NO se produce en el epitelio, la musculatura lisa, el plexo neural y en los mastocitos. Además, el NO puede ser producido en los leucocitos (neutrófilos y monocitos) existentes en el territorio intestinal. En condiciones normales, la perfusión de la mucosa intestinal es regulada por el NO producido en el endotelio vascular (eNOS) del territorio mesentérico. Fisiológicamente, el NO mantiene una perfusión adecuada en el intestino, inhibiendo la adhesión de los neutrófilos en el endotelio, bloqueando la adhesión de las plaquetas y previniendo la activación de los macrófagos, modula la regulación de la musculatura lisa intestinal (94, 133). Esto nos indujo a pensar que el NO participa en la inflamación intestinal aguda inducida por Indo.

De nuestros resultados (Fig 26) se observa que el L-NAME aumenta significativamente el daño intestinal, lo cual involucra la participación del NO constitutivo (endotelial). Este efecto fue casi similar a producido por el AM; esto confirma la importancia de la acción vasodilatadora del NO en este modelo experimental. El NO presenta, en este caso, una actividad antiinflamatoria. En este modelo experimental (105) también se hace evidente la actividad protectora del MET, lo cual está de acuerdo con los trabajos de Prado (96) y Rojas (97), quienes han encontrado que el MET es un donador de NO en el intestino delgado. En nuestros experimentos, el MET también previno el aumento del daño intestinal que produce el L-NAME (Fig 31), lo cual definitivamente demuestra la participación del NO y su efector protector en este modelo experimental.

Este enfoque químico ha conducido al nacimiento de una nueva clase de AINES, los nitro-AINES (NO-AINES), los cuales liberan NO y no producen daño gastrointestinal (134, 135, 136). Del Soldato *et al.* (137) han experimentado con nitro-aspirinas y encontraron que el aporte local de NO puede sustituir a las prostaglandinas restaurando el balance entre los factores agresivos y defensivos en el estómago que fue alterado por la inhibición de la enzima COX-1. Estos hechos han creado, también, una oportunidad para que se puedan sintetizar NO-derivados de principios activos de plantas medicinales que puedan superar las limitaciones de los donadores existentes (138)

Por otro lado, también se conoce que en estados de inflamación intestinal prolongada existe una sobreproducción de NO; entonces, se produce lesión de la mucosa, hiperemia y ruptura de la barrera, propiciando la translocación bacteriana (39, 139) de esta manera se puede iniciar y perpetuar un proceso séptico que contribuye a graves cuadros de inestabilidad hemodinámica en relación con la hipotensión refractaria que produce. En base a este conocimiento, nos propusimos como uno de nuestros objetivos demostrar la participación del NO en el modelo experimental propuesto por Yamada *et al.* (22), quienes propusieron un modelo para inducir la inflamación intestinal crónica mediante la administración de dos inyecciones de indometacina (7.5 mg/Kg, diariamente) y el efecto inflamatorio lo atribuyeron a un efecto sinérgico entre la Indo, los ácidos biliares y las bacterias lumenales; sin embargo no involucraron la participación del NO.

Nuestros resultados demuestran que el daño intestinal se hace evidente desde el primer día de la administración de la indometacina y aumenta progresivamente hasta presentar su máxima expresión al tercer y cuarto día; después se observa que hay recuperación tisular (Fig 48). La determinación plasmática del NO en estas ratas demuestra que existe una correlación directa entre los niveles plasmáticos de NO y la lesión macroscópica producida por la indometacina (Fig 49). Entonces, es un hecho que grandes cantidades de óxidos de nitrógeno se están formando en la inflamación vía NO, pero con mayores reactividades, aumentando la permeabilidad vascular intestinal (38, 139).

Este hallazgo experimental demuestra que existe una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de NO con el grado de lesión macroscópica en el modelo de inflamación intestinal crónica propuesto por Yamada *et al.* (22), y apertura nuevas oportunidades para la investigación y desarrollo de drogas antiinflamatorias a partir de plantas medicinales. Ahora contamos con un método no invasivo que supera las limitaciones bioéticas del trabajo con animales de experimentación; pero también, es más práctico, ya que solamente se requiere de algunos microlitros de sangre para llevar a cabo la determinación; Esto facilita también que se pueda trabajar con ratones, lo cual hace que el método sea más sencillo pero seguro.

De la misma forma, que en otras circunstancias, la inhibición selectiva de la iNOS y el mantenimiento de la eNOS es beneficiosa, lo cual ha motivado el desarrollo de un gran número de inhibidores selectivos de la sintasa de la NO; sin embargo, las

reacciones colaterales de estas sustancias limitan su uso clínico. Como alternativa, en los últimos años se viene apreciando un notable cambio hacia la utilización de las plantas medicinales con actividades antioxidante y antiinflamatoria, por eso nos propusimos como último objetivo evaluar el efecto protector de las hojas de UG en el modelo de Yamada *et al.*; mediante la determinación de su efecto sobre la disminución de los niveles plasmáticos de NO. Previamente, nosotros (23) hemos determinado que tanto la corteza como las hojas de la UG tienen efector protector en las ratas con enteritis inducida por indometacina en este modelo experimental; sin embargo, las hojas fueron las más efectivas. Además, de un ensayo *in vitro*, realizado por nosotros (140) se concluyó también que las hojas de la UG presentan una mejor acción frente al NO y el NO₂⁻. Recientemente Giraldo Bardalama (24) han encontrado actividad antiinflamatoria en los flavonoides de las hojas de la UG utilizando el modelo de Yamada *et al.* Por todas estas razones, hemos utilizado a las hojas de la UG como material biológico para el ensayo.

Es importante notar que la concentración ensayada de las hojas de UG es similar a la que usa tradicionalmente y la administración fue per oral. Generalmente se recomienda que la UG se prepare hirviendo 20 g en un litro de agua, o sea al 2% (40 mg/Kg). Nuestros resultados (Fig 53) indican que la uña de gato disminuye significativamente los niveles de NO plasmáticos a partir del tercer día de administración de la Indo, y se hace más evidente al cuarto. Esto concuerda con los resultados de Sandoval-Chacón *et al.* (21) quienes encontraron *in vitro* que la corteza de la UG disminuye los niveles de iNOS mRNA en células epiteliales de intestino humano (HT29) y en macrófagos de murino (RAW 264.7), a través de la inhibición del NF-κB (21) y por la potente inhibición del TNFα (141).

La aplicación de este experimento se puede extender a otras plantas medicinales con posible actividad antiinflamatoria intestinal crónica y contribuir al estudio científico de la flora medicinal peruana.

VI. CONCLUSIONES

De la evaluación del rol del óxido nítrico en ratas a las que se les indujo experimentalmente inflamación gástrica e intestinal, aguda y crónica, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- 1) Se puso en evidencia que el óxido nítrico participa en la inflamación experimental (modelos propuestos por Robert *et al.* (1979); Yamada *et al.* (1993); Davies y Jamali (1997) y Ramos Anicama (2003).
- 2) Se observó que el óxido nítrico tiene actividad citoprotectora en la inflamación aguda inducida en modelos experimentales (Robert *et al.*; Davies y Jamali; y Ramos Anicama); mientras que tiene un efecto perjudicial en la inflamación crónica inducida experimentalmente en ratas (Yamada *et al.*).
- 3) Se determinó que existe una correlación directa entre la magnitud del daño intestinal (según el modelo propuesto por Yamada *et al.*) y los niveles plasmáticos de óxido nítrico; lo cual hace posible contar con un método no invasivo para evaluar científicamente la actividad de plantas medicinales con posible actividad antiinflamatoria
- 4) Se demostró el efecto protector de la *Uncaria tomentosa* (Uña de gato) en la inflamación intestinal crónica (en el modelo propuesto por Yamada *et al.*) mediante la disminución de la producción de NO, lo cual constituye una nueva evidencia científica de su acción antiinflamatoria intestinal crónica.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
2. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *TIBS* 1992; 399-402.
3. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-258.
4. Morris SM, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 1994; 266: E829-E839.
5. Michel T, Xie OW, Nathan C. Molecular biological analysis of nitric oxide synthases. In: Feelisch M, Stamler J (eds) *Methods in Nitric Oxide Research*. John Wiley and Sons. NY 1996, pp.161-175.
6. Gross V, Arndt H, Andus T, Palitzsch KD, and Scholmerich J. Free radicals in inflammatory bowel diseases pathophysiology and therapeutic implications. *Hepatogastroenterology* 1994; 41: 320 – 327.
7. Davies NM, Jamali F. Pharmacological protection of NSAID-induced intestinal permeability in the rat: effect of tempo and metronidazole as potential free radical scavengers. *Human & Experimental Toxicology* 1997; 16: 345 – 349.
8. Szabo S, Trier JS, Brown A, Schnoor J. Early vascular injury and increased vascular permeability in gastric mucosal injury caused by ethanol in the rat. *Gastroenterology* 1985; 88: 228-236.
9. Oates PJ, Hakkinen JP. Studies on the mechanism of ethanol-induced gastric damage in rats. *Gastroenterology* 1988; 94: 10-21.
10. Sabo S. Mechanism of mucosal injury in the stomach and duodenum: time-sequence analysis of morphologic, functional, biochemical and histochemical studies. *Scand J Gastroenterol* 1987; 2: 21-28.
11. Ashley SW, Sonnenschein LA, Cheung LY. Focal gastric mucosal blood at the site of aspirin-induced ulceration. *Am J Surg* 1985; 149: 53-59.
12. Gana TJ, Huhlewych JR, Koo J. Focal gastric mucosal blood flow in aspirin-induced ulceration. *Ann Surg* 1987; 205: 399-403.
13. Kitahora T, Guth PH. Effect of aspirin plus hydrochloric acid on the gastric mucosal microcirculation. *Gastroenterology* 1987; 93: 810-817.

14. Granger DN, McCord JM, Parks DA, Hallmarth ME. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. *Gastroenterology* 1986; 90: 80-84.
15. Kvietys PR, Smith SM, Grisham MB, Mancini EA. 5-Aminosalicylic acid protects against ischemia/reperfusion-induced gastric bleeding in the rat. *Gastroenterology* 1988; 94: 733-738.
16. McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RMJ, Whittle BJR, Moncada S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J* 1989; 261: 293-296.
17. Del Soldato P, Foschi D, Benoni G, Scarpignato C. Oxygen free radicals interact with indomethacin to cause gastrointestinal injury. *Agents and Actions* 1985; 17: 484-488.
18. Chmaitse HM, Antoon JS, Kvietys PR, Grisham MB, Perry MA. Role of leukocytes in indomethacin-induced small bowel injury in the rat. *Am J Physiol* 1994; 266: G239-G246.
19. Lefer AM, and Lefer DJ. Nitric Oxide II. Nitric oxide protects in intestinal inflammation. *Gastrointest Liver Physiol* 1999; 39: 572-575.
20. McCafferty DM, Mudgett JS, Swain MG *et al.* Inducible nitric oxide synthase plays a critical role in resolving intestinal inflammation. *Gastroenterology* 1997; 112:1022-1027.
21. Sandoval-Chacón M, Thompson JH, Zhang X-J, Liu X, Mannick EE, Sadowska-Krowiscka H, Charbonnet RM, Clark DA, Miller MJS. Antiinflammatory actions of cat's claw: the role of NF- κ B. *Aliment Pharmacol Ther* 1998; 12: 1279-1289.
22. Yamada T, Deitch E, Specian RD, Perry MA, Sartor RB, Grisham MB. Mechanism of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation* 1993; 17: 641-62.
23. Angulo HP, Wilder AR, Míguez SMP, Matas CP. Actividad de las hojas y alcaloides de la uña de gato (*Uncaria tomentosa* Willd. D.C.) en el modelo de la inflamación intestinal crónica de Yamada et al. *Revista de la Academia Peruana de Farmacia* 2000; 15: 37-44.
24. Giraldo Bardalama LJ, Hernández Peves MM, Angulo Herrera P, Fuertes Ruitón C. Actividad antinitrosativa y Antiinflamatoria de los flavonoides de las hojas de *Uncaria tomentosa* Willd DC (Uña de gato). *Revista de la Sociedad Química del Perú* 2003; 69: 229-242.

25. Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Hanchar AJ. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology* 1979; 77: 433-443.
26. Peskar BM, Lange K, Hoppe U, Peskar BA. Ethanol stimulates formation of leukotriene C₄ in rat gastric mucosa. *Prostaglandins* 1986; 31: 283-293.
27. Pihan G, Regillo C, Szabo S. Free radicals and lipid peroxidation in the ethanol- or aspirin –induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 1987; 32: 1395-1401.
28. Evangelista S, Meli A. Influence of antioxidants and radical scavengers on ethanol-induced gastric ulcers in the rat. *Gen Pharm* 1985; 16: 285-286.
29. Pihan G, Majzoubi D, Haundenschild C, Trier JS, Szabo S. Early microcirculatory stasis in acute gastric mucosal injury in the rat and prevention by 16, 16-dimethyl prostaglandin E₂ or sodium thiosulfate. *Gastroenterology* 1986; 91: 1415-1426.
30. Guth PH, Paulsen G, Nagata H. Histologic and microcirculatory changes in alcohol-induced gastric lesions in the rat: effect of prostaglandin cytoprotection. *Gastroenterology* 1984; 87: 1083-1090.
31. Diel F, Borck H, Hosenfeld S. Effects of somatostatin on ethanol-induced gastric erosions in the rat: role of mast cells. *Agents Actions* 1986; 18: 273-275.
32. Hakanson R, Owman C. Concomitant histochemical demonstration of histamine and catecholamines in enterochromafin-like cells of gastric mucosa. *Life Sci* 1967; 6: 759-766.
33. Kvietys PR, Twohig B, Danzell J, Specian RD. Ethanol-induced injury to the rat gastric mucosa: role of neutrophils and xanthine oxidase-radicals. *Gastroenterology* 1990; 98: 909-920.
34. Somasundaram S, Hayllar H, Rafi S, Wrigglesworth, J, Macpherson A and Bjarnason I. The biochemical basis of non-steroidal anti-inflammatory drug-induced damage to the gastrointestinal tract: a review and a hypothesis. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 289-299.
35. Beirne JA, Bianchine JR, Johnson PC, *et al.* Gastrointestinal blood loss caused by tolmetin, aspirin and indomethacin. *Clin Pharmacol Therap* 1974; 16: 821-825.
36. Fries JF, Miller SR, Spitz BW, Williams CA, Hubert HB, Bloch DA. Toward an epidemiology of gastropathy associated with nonsteroidal anti-inflammatory drug use. *Gastroenterology* 1989; 96: 647-655.
37. Brodie DA, Cook PG, Bauer BJ, Dagle GE. Indomethacin-induced intestinal lesions in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1970; 17: 615-624.

38. Wallace JL, Keenan CM, Granger DN. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *Am J Physiol* 1990; 259: G462-G467.
39. Wallace JL, McKnight GW, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson J, Anderson DC, Granger DN, Kubes P. Role of endothelial adhesion molecules in NSAID-induced gastric mucosal injury. *Am J Physiol* 1993; 265: G993-G998.
40. Wallace JL, McKnight GW, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson J, Anderson DC, Granger DN, Kubes P. Role of endothelial adhesion molecules in NSAID-induced gastric mucosal injury. *Am J Physiol* 1993; 265: 993-998.
41. Bjarnason I, Hayllar J, Macpherson A and Russell A. Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology* 1993; 104: 1832-1847.
42. McCall TB, Boughton-Smith NK, Palmer RMJ, Whittle BJR, Moncada S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem J* 1989; 261: 293-296.
43. MacNaughton WK, Cirino G, Wallace JL. Endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) has protective actions in the stomach. *Life Sci* 1989; 45: 1869-1876.
44. Whittle BJR, Lopez-Belmonte J, Moncada S. Regulation of gastric mucosal integrity by endogenous nitric oxide: interactions with prostanoids and sensory neuropeptides in the rat. *Br J Pharmacol* 1990; 99: 607-611.
45. Satoh H, Inada I, Hirata T, and Maki Y. Indomethacin produces gastric antral ulcers in the refed rat. *Gastroenterology* 1981; 81: 719-725.
46. Robert A. An intestinal disease produced experimentally by a prostaglandin deficiency. *Gastroenterology* 1975; 69: 1045-1047.
47. Bjarnason I, Williams P, Smethurst P, Peters T and Levi A. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on the permeability of the human small intestine. *Gut* 1986; 27: 1292-1297.
48. Reuter B, Davies M, and Wallace J. Nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy in rats: role of permeability, bacteria, and enterohepatic circulation. *Gastroenterology* 1997; 112:109-117.
49. Yamada T, Perry M, Sartor R, Marshall S and Grisham M. Mechanisms of indomethacin-induced intestinal inflammation (abstract). *Gastroenterology* 1992; 102: A715.
50. Brodie DA, Cook PG, Bauer BJ, Dagle GE. Indomethacin-induced intestinal lesions in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1970; 17: 615-624.

51. Vaananen P, Meddings J and Wallace J. Role of oxygen-derived free radicals in indomethacin-induced gastric injury. *Am J Physiol* 1991; 261: G470-G475.
52. Wallace J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and gastroenteropathy: the second hundred years. *Gastroenterology* 1997; 112: 1000-1016.
53. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 1986; 251: 567-574.
54. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN, Hamilton SR, McCord JM. Ischemic injury in the cat small intestine: role of superoxide radicals. *Gastroenterology* 1982; 82: 9-15.
55. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals and feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981; 81: 22-29.
56. Miura S, Suematsu M, Tanaka S, Nagata H, Houzawa S, Suzuki M, Kurose I, Serizawa H and Tsuchiya M. Microcirculatory disturbance in indomethacin-induced intestinal ulcer. *Am J Physiol* 1991; 261: G213-G219.
57. Beck P, Xavier R, Lu N, Nanda, Dinauer M, Podolsky D and Seed B. Mechanisms of NSAID-induced gastrointestinal injury defined using mutant mice. *Gastroenterology* 2000; 119: 699-705.
58. Satoh H, Guth P and Grossman M. Role of bacteria in gastric ulceration produced by indomethacin in the rat: cytoprotective action of antibiotics. *Gastroenterology* 1983; 84: 483-489.
59. Kent T, Cardelli R and Stamier F. Small intestinal ulcers and intestinal flora in rats given indomethacin. *Am J Pathol* 1969; 54: 237-249.
60. Robert, A. and Asano, T. Resistance of germ free rats to indomethacin-induced intestinal lesions. *Prostaglandins* 1977; 14: 333-341.
61. Furchgott RF, Zawadski JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 377-386.
62. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-9269.
63. Palmer RWJ, Ferrige AS, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
64. Culotta E, Koshland DE Jr (1993) NO news is good news. *Science* 1993; 258: 1862-1863.
65. Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide: action and properties. *FASEB* 1989; 3: 31.
66. Vaughn MW, Kuo L, Liao JL. Effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation. *Heart Circ Physiol* 1998; 43: H1705-H1714.

67. Liu X, Miller MJS, Joshi M, Sadowska-Krowicka H, Clark DA, and Lancaster JR Jr. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem* 1998; 273: 18709-18713.
68. Green IC, Ruiz de Luzuriaga, Wagner DA, *et al.* Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78.
69. Marletta M. Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol* 1988; 1: 249-257.
70. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-666.
71. Palmer RMJ, Rees DD, Moncada S. L-Arginine is physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Comm* 1988; 153: 231-37.
72. Palmer RMJ, Moncada S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 158: 348-355.
73. Lowenstein Ch, Dinerman JL, Syner SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120: 227.
74. Mondaca S, López Jaramillo P. Función de la pared vascular. Prostaciclina y óxido nítrico. *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología* 1992; Vol III, Salamanca.
75. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 377: 239-242.
76. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie Q-W, Sokol K, Hutchinson N, Chen H, Mudgett JS. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 1995; 81: 641-650.
77. Huang PL, Dawson TM, Brecht DS, Snyder SH, Fishman MC. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 1993; 175: 1273-1286.
78. Nelson RJ, Demas GE, Huang PL, Fishman MC, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Behavioral abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 378: 383-386.
79. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR, *et al.* Analysis of nitrate, nitrite and N nitrate in biological fluids. *Ann Biochem* 1982; 126: 131-138.

80. Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, *et al.* Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg* 1991; 214: 621-626.
81. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329:2002–2012.
82. Pozo D. Producción de óxido nítrico y su modulación en el sistema inmune y el sistema nervioso. *Arch Neurocienc* 1998; 2: 84-94.
83. Katsuki S, Arnold W, Mittal C, Murad F. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerine and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res* 1977; 3:23–35.
84. Wang X, Robinson PJ. Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J Neuroche* 1997; 68: 443-56.
85. Pineda J, Kogan JH, Aghajanian, GK. Nitric oxide and carbon monoxide activate locus coeruleus neurons through a cGMP-dependent protein kinase: involvement of a nonselective cationic channel. *J Neurosc* 1996; 16: 1389-1399.
86. Grover R. An open-label dose escalation study of the nitric oxide synthase inhibitor, N- methyl-L- arginine hydrochloride (546C88), in patients with septic shock. *Crit Care Med* 1999; 27: 913-922.
87. Stuehr DJ, Griffith OW. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1992; 65: 287-346.
88. Bjarnason I, Hopkinson N, Zanelli G, Prouse P, Smethurst P, Levi AJ. Treatment of non-steroidal anti-inflammatory drug induced enteropathy in man. *Gut* 1991; 31: 777-780.
89. Bjarnason I, Hayllar J, Smethurst P, Price A, Gumpel MJ, Levi J. Studies on the pathogenesis of non-steroidal anti-inflammatory drug induced enteropathy in man. *Gastroenterol* 1991; 100 A198.
90. Lichtman SN, Keku J, Schwab JH, Sartor RB. Hepatic injury associated with small bowel bacterial overgrowth in rats is prevented by metronidazole and tetracycline. *Gastroenterol* 1991; 100: 513-519.
91. Sutherland L, Singleton, Sessions, *et al.* Double blind, placebo controlled trial of metronidazol in Crohn´s disease. *Gut* 1991; 32: 1071-1075.
92. Davies GR, Wilkie ME, Rampton DS. Effects of metronidazole and misoprostol on indomethacin-induced changes in intestinal permeability. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 417-425.

93. Bjarnason I, Hayllar J, Smethurst P, Price A, Gumpel MJ. Metronidazol reduces intestinal inflammation and blood loss in nonsteroidal anti-inflammatory drug induced enteropathy. *Gut* 1992; 31: 1204-1208.
94. Kubes P, Szuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 1991; 88: 4651-4659.
95. Akamatsu H. The inhibition of free radical generation by human neutrophils through the synergistic effects of metronidazole with palmitoleic acid: A possible mechanism of action of metronidazole in rosacea and acen. *Archives of Dermatology Research* 1991; 282: 449-454.
96. Prado Gutiérrez Wilber. Efecto protector de la L-arginina y el metronidazol como potenciales donadores de óxido nítrico en la enteritis aguda. Tesis Titulación. Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Huamanga, 2002.
97. Rojas Porto Wilber. El metronidazol como donador de óxido nítrico en el mecanismo de la actividad protectora y Antiinflamatoria en una inflamación intestinal aguda experimental. Tesis de Titulación. Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad Wiener. Lima, 2004.
98. Oaki N, Jonson G, Lefer AM. Beneficial effects of two forms of NO administration in feline splanchnic artery occlusion shock. *Am J Physiol* 1990; 258: G275-G281.
99. Andrews FJ, Malcontenti-Wilson C, O'rien PE. Protection against gastric ischemia-reperfusion injury by nitric oxide generators. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 366-373.
100. Matas P, Silva do Amaral C, et al. Óxido nítrico y toxicidad inducida por paraquat. En *Actas de la VI Reunión del Grupo Español de Radicales Libres y II Reunión Iberoamericana*, 77. Santa María, Cádiz (España), 26-28 de junio del 2000.
101. Wallace JL, Morris GP, Krause EJ, Greaves SE. Reduction by cytoprotective agents of ethanol-induced damage to the rat gastric mucosa: a correlated morphological and physiological study. *Can J physiol Pharmacol* 1982; 60: 1686-1699.
102. Wallace JL, Hogaboam CM, McKnight GW. Platelet-activating factor (PAF) mediators gastric damage induced by hemorrhagic shock. *Gastrointest Liver Physiol* 1990; 22: 140-146.
103. Miura S, Suematsu M, Tanaka S, Nagata H, Houzawa S, Suzuki M, Kurose I, Serizawa H, Tsuchiya M. Microcirculatory disturbance in indomethacin-induced intestinal ulcer. *Gastrintest Liver Physiol* 1991; 24: G213-G219.

104. Wallace JL, Keenan CM, Granger DN. Gastric ulceration induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is a neutrophil-dependent process. *Am J Physiol* 1990; 259: G462-G467.
105. Ramos Anicama, Dunia S. Propuesta de un modelo experimental de enteritis aguda inducida por indometacina en ratas albinas. Tesis de Titulación. Facultad de Medicina Veterinaria Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima 2003.
106. Reuter BK, Davies NM, Wallace JL. Nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy in rats: Role of permeability, bacetria, and enterohepatic circulation. *Gastroenterol* 1997; 112: 109-117.
107. Unno N, Wang H, Menconi MJ, Tytgat SHAJ, Larkin V, Smith M, Morin MJ, Chavez A, Hodin RA, Fink MP. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology* 1997; 113: 1246-1257.
108. Moshage H, Kok B, Huizenga R, Jansen P. Nitrite and nitrate determination in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 1995; 41: 892-896.
109. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB Jr. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol* 1996; 268: 142-151.
110. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001; 5: 62-71.
111. Matas Cascos P, Morales Martín AI, Angulo Herrera P, Silva Do Amaral C, Núñez Bravo MD, Míguez Santillán MP. Determinación de los niveles de nitratos/nitritos en plasma como indicador de la producción de óxido nítrico. *Química Clínica* 2001; 20: 402.
112. Preiser JC, Lejeune P, Roman A *et al.* Methylene blue administration in septic shock. A clinical trial. *Crit Care Med* 1995; 23: 259-64.
113. Lovgren O, Allander E. Side effects of indomethacin. *Br Med J* 1964; 1: 118.
114. Katz AM, Pearson CM, Kennedy JM. A clinical trial of indomethacin in rheumatoid arthritis. *Clin Pharmacol Therap* 1965; 6: 25-30.
115. Djahanguiri B. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1969; 4: 265-267.
116. Somogyi A, Kovács K, Selye H. Jejunal ulcers produced by indomethacin. *J Pharm Pharmacol* 1969; 21: 122-123.
117. Lacy ER, Ito S. Microscopic analysis of ethanol damage to rat gastric mucosa after treatment with a prostaglandin. *Gastroenterol* 1982; 83: 619-25.

118. Andrews FJ, Malcontenti-Wilson C, O'rien PE. Protection against gastric ischemia-reperfusion injury by nitric oxide generators. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 366-373.
119. McKnight GM, Smith LM, Drummond RS *et al*. Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut* 1997; 40:211-214.
120. Lundberg JO, Weitzberg E, Lundberg JM *et al*. Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut* 1994; 35:1543-1546.
121. Craven PA, DeRobertis FR. Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and heme proteins: evidence of the involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation. *J Biol Chem* 1978; 253: 8433-8443.
122. Pique JM, Whittle BJR, Esplugues JV. The vasodilator role of endogenous nitric oxide in the rat gastric microcirculation. *Eur J Pharmacol* 1989; 174: 293-296.
123. Whittle BJR, Boughton-Smith NK, Moncada S. Biosynthesis and role of endothelium-derived vasodilator, nitric oxide, in the gastric mucosa. *Ann NY Acad Sci* 1992; 662: 126-139.
124. Lopez-Belmonte J, Whittle BJR, Moncada S. The actions of nitric oxide donors in the prevention or induction of injury to the gastric mucosa. *Br J Pharmacol* 1993; 108: 73-78.
125. Terano A, Hiroishi H, Ota S, Shiga J, Sugimoto T. Role of oxygen derived free radicals in ethanol-induced damage in rat stomach. *Gastroenterol* 1986; 90: 1661.
126. Gusik TJ, West NEJ, Pillai R, Taggart DP, Channon KM. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Circulation* 2002; 39: 1088-1094.
127. Wallace JL. Mechanisms of NSAID-induced gastrointestinal damage: potential for development of GI-safe NSAIDs. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 71: 98-102.
128. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4651-4655.
129. Brown JF, Keates AC, Hanson PJ, Whittle BJR. Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells. *Gastrointest Liver Physiol* 1993; 28: G418-G422.
130. Pique JM, Esplugues JV, Whittle BJR. Endogenous nitric oxide as a mediator of gastric mucosal vasodilatation during acid secretion. *Gastroenterol* 1992; 102: 169-174.
131. Rubanyi GM, Ho EH, Cantor EH, Lumma WC, Parker Botelho LH (1991) Cytoprotective function of nitric oxide: inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 181: 1392-1397.

132. Gaboury J, Woodman RC, Granger DN, Reinhardt P, Kubes P. Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide. *Am J Physiol* 1993; 265: 862-867.
133. Angulo Herrera P, Díaz Coahila D, Espinoza Blanco JA, Fernández Anhuamán VE y col. Implicaciones farmacológicas y toxicológicas del óxido nítrico en la inflamación intestinal I. Una perspectiva general. *MV Rev Cien Vet* 2001; 17: 7-10.
134. Wallace JL, and Cirino G. The development of gastrointestinal-sparing nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Trends in Pharmacology Sciences* 1994; 15: 405-406.
135. Wallace JL, Reuter B, Cicala C, McKnight W, Grisham MB, Cirino G. Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat. *Gastroenterol* 1994; 107: 173-179.
136. Wallace JL, McKnight, Wilson TL, Del Soldato P, Cirino G. Reduction of shock-induced gastric damage by a nitric oxide-releasing aspirin derivative: role of neutrophils. *Am J Physiol* 1997; 273: G1246-G1251.
137. Del Soldato P, Sorrentino R, Pinto A. NO-aspirins: a class of new anti-inflammatory and antithrombotic. *Trends in Pharmacology Sciences* 1999; 20: 319-323.
138. Angulo Herrera P, Míguez Santiyán MP; Matas Cascos P. Oxido nítrico I. Inflamación gastrointestinal y plantas medicinales. *Boletín de la Sociedad Química del Perú* 2001; 67: 207-221.
139. Kubes P, Wallace JL. Nitric oxide as a mediator of gastrointestinal injury? – say it ain't so. *Mediators Inflammation* 1995; 4: 8137-8141.
140. Angulo Herrera P, Andamayo Flores DE, Matas Cascos P, Míguez Santillán MDP (2001) Acción “in vitro” de la uña de gato (*Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*) sobre el nitrito y el óxido nítrico. *Boletín de la Sociedad Química del Perú* 2001; 67: 241-248.
141. Sandoval-Chacón M, Charbonnet RM, Okuhama NN, Roberts J, Krenova Z, Trentacosti AM, Miller MJS. Cat's claw inhibits TNF α production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. *Free Radical Biology & Medicine* 2000; 29: 71-78.

ANEXOS

TABLA 1: Evidencia experimental de la participación del óxido nítrico en la inflamación gástrica aguda inducida por etanol 70°

	CONTROL (%)	ETANOL 70° (%)	AM (%)	L-NAME (%)	NPS (%)	NIT (%)
	0	52	80	80	18	10
	0	64	90	98	23	10
	0	50	92	96	18	9
	0	65	99	91	23	10
	0	67	80	95	21	11
	0	61	92	92	18	12
	0	62	96	89	19	10
	0	59	90	83	19	10
	0	54	94	83	22	10
	0	53	95	88	20	9
	0	60	92	88	19	9
	0	53	90	89	21	12
	0	66	85	88	17	9
	0	67	98	87	23	9
	0	52	94	89	21	10
PROMEDIO	0	59	91	89	20	10
DESVIACIÓN STANDAR	0	6.10	5.70	4.90	2.0	1.0

TABLA 2: Evidencia experimental de la participación del óxido nítrico en la inflamación gástrica aguda inducida indometacina

	CONTROL (mm)	INDO (mm)	NIT (mm)	NIT + AM (mm)
	0	48	12	28
	0	47	11	29
	0	46	13	26
	0	45	14	32
	0	45	11	31
	0	45	12	30
	0	48	11	30
	0	50	12	32
	0	51	14	35
	0	48	16	30
	0	49	15	31
	0	47	13	28
	0	45	12	27
	0	43	15	29
	0	48	14	32
PROMEDIO	0	47	13	30
DESVIACIÓN ESTANDAR	0	2.17	1.60	2.30

TABLA 3: Evidencia experimental de la participación del óxido nítrico en la inflamación intestinal aguda inducida por indometacina

	CONTROL (%)	INDO (%)	AM (%)	L-NAME (%)
	0	32	64	74
	0	31	63	62
	0	30	77	68
	0	30	69	68
	0	33	68	75
	0	35	74	74
	0	32	72	63
	0	32	61	62
	0	34	70	67
	0	35	75	67
	0	36	65	61
	0	33	69	68
	0	34	76	72
	0	35	72	73
	0	33	75	67
PROMEDIO	0	33	70	68
DESVIACIÓN STANDAR	0	1.85	5.0	4.70

TABLA 4: Evidencia experimental del efecto protector de algunos donadores de oxido nítrico en inflamación gástrica inducida por etanol 96°

	CONTROL (%)	ETANOL 96 ° (%)	NIT (%)	NPS (%)	MET (%)
	0	96	9	23	13
	0	97	9	25	14
	0	98	8	24	16
	0	81	10	22	14
	0	82	11	21	18
	0	83	12	19	14
	0	80	10	18	14
	0	92	10	20	16
	0	93	13	20	16
	0	85	13	23	17
	0	87	9	22	17
	0	89	8	23	14
	0	92	8	24	13
	0	90	10	23	15
	0	90	11	24	14
PROMEDIO	0	89	10	22	15
DESVIACIÓN STANDAR	0	5.85	1.60	2.18	1.62

TABLA 5: Evidencia experimental del efecto protector de algunos donadores de óxido nítrico en la inflamación intestinal aguda inducida por indometacina

	CONTROL (%)	INDO (%)	MET (%)	L-NAME (%)	L-NAME + MET (%)
	0	33	10	64	10
	0	32	9	66	12
	0	44	9	74	12
	0	45	9	75	11
	0	41	8	74	10
	0	42	9	76	14
	0	37	9	75	12
	0	42	11	78	13
	0	42	12	74	12
	0	41	12	76	14
	0	38	10	79	15
	0	43	9	75	13
	0	39	11	66	11
	0	39	10	78	10
	0	43	12	65	11
PROMEDIO	0	40	10	73	12
DESVIACIÓN STANDAR	0	3.0	1.36	5.0	1.51

TABLA 6: Asociación entre los niveles plasmáticos de óxido nítrico y la inflamación intestinal crónica de acuerdo con el modelo propuesto por Yamada *et al.*

6.1 *Indometacina*

DIAS	Concentración Plasmática (μ moles/ml)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
	3.4	5.1	6.5	12.5	15.9	8.6	5.6	4.7
	3.5	5	6.4	12.4	15.7	8.5	5.8	4.7
	3.8	5	6.5	12.6	15.5	8.4	5.8	4.5
	3.9	4.8	6.2	12.7	15.6	8.4	5.7	4.7
	3.8	4.9	6.8	12.8	15.6	8.3	5.6	4.5
	3.4	5.2	6.2	12	15.6	8.5	5.5	4.4
	3.8	5.2	6.1	12.8	16	8.6	5.5	4.8
	3.9	5.5	6.2	12.9	16	8.9	5.5	4.9
	3.5	5.4	6.4	12.3	15.8	8.8	5.8	4.8
	3.5	5.2	5.9	12.4	16.1	8.7	5.7	4.9
	3.6	5.1	7.4	12.5	16.1	8.8	5.7	4.7
	4	5.7	6.8	12.4	16.1	8.8	5.6	4.8
	3.9	5.3	6.6	12.9	15.2	8.4	5.9	4.8
	3.7	5.2	6.8	12.6	16.4	8.8	5.8	5
	3.9	4.9	6.9	12.8	15.8	8.6	5.9	4.9
PROMEDIO	3.71	5.17	6.51	12.57	15.83	8.61	5.69	4.74
DESVIACIÓN STANDAR	0.21	0.24	0.38	0.25	0.30	0.19	0.14	0.17

6.2 Indometacina + uña de gato

Concentración Plasmática (μ moles/ml)								
DIAS	0	1	2	3	4	5	6	7
	3.8	5.4	6.6	7.8	10.6	5.8	5.1	4.6
	3.6	5.4	6.5	6.8	10.5	5.7	5	4.5
	3.8	5.3	6.6	7.5	9.6	5.7	5	4.8
	3.9	5.1	6.2	7.2	10.2	5.7	4.7	4.8
	4	5.2	6.2	7.2	10.1	5.2	4.9	4.7
	4.2	5.2	6	6.9	9.9	5.2	4.8	4.5
	4.2	5.2	6	7.3	10.4	5.3	4.8	4.5
	4	5	6.2	7.4	10.5	5.8	5.6	4.5
	4.1	5.3	6.2	7.4	10.6	5.6	5.5	4.3
	3.8	4.9	6.4	7.2	10.4	5.8	5.5	4.8
	4.2	4.7	6.5	7.4	10.7	5.4	5.6	4.8
	3.9	5.1	6.4	7.8	10.5	5.9	5.2	4.2
	3.9	5.4	6.5	7.5	10.9	5.9	5.6	4.2
	3.8	5.5	6.5	7.5	10.5	5.9	5.8	4.6
	3.9	5.5	6.3	7.3	10.6	5.8	5	4.7
PROMEDIO	3.94	5.21	6.34	7.35	10.40	5.65	5.20	4.57
DESVIACIÓN STANDAR	0.18	0.23	0.20	0.27	0.33	0.25	0.36	0.21